



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากกากชาเขียว
ต่อการเรียนรู้และความจำ

โดย ดร. พรนรินทร์ เทพวาราพฤกษ์ และคณะ

สิงหาคม 2552



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากกากชาเขียว
ต่อการเรียนรู้และความจำ

โดย ดร. พรนรินทร์ เทพวราพฤกษ์ และคณะ

สิงหาคม 2552

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากกากชาเขียว ต่อการเรียนรู้และความจำ

คณะผู้วิจัย

สังกัด

1. ดร. พรนรินทร์ เทพาราวพฤษย์

ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์

2. ผศ.ดร. นิวัติ เทพาราวพฤษย์

ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์

3. ดร.สุธิรา เลิศตระกูล

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์

มหาวิทยาลัยนเรศวร จ. พิษณุโลก

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สารบัญ

สารบัญ	3
Execucutive Summary	6
บทคัดย่อ	8
ABSTRACT	10
บททวนวรรณกรรม	11
1. โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease)	11
2. พยาธิสรีรวิทยาของโรคอัลไซเมอร์	13
3. การจำลองภาวะโรคอัลไซเมอร์ในสัตว์ทดลองด้วย A β	17
4. การทดสอบพฤติกรรมที่เกี่ยวข้องกับการเรียนรู้และความจำ	19
4.1 Morris's Water Maze (MWM) test	19
4.2 Radial Arm Maze (RAM) test	20
4.3 Novel Object Recognition (NOR) test	21
5. ชาเขียว (Green Tea)	22
6. กากชาเขียว (green tea by-product)	26
วิธีดำเนินการวิจัย	28
1. สัตว์ทดลอง	28
1.1 การศึกษาผลของสารสกัดชาเขียวและกากชาเขียวปกติและที่ถูกดัดแปลงคาเฟอีนออกต่อพฤติกรรมเคลื่อนไหว	28
1.2 การศึกษาผลของชาเขียวและกากชาเขียวในการป้องกันความบกพร่องด้านการเรียนรู้และความจำ	29
1.3 การศึกษาผลของชาเขียวและกากชาเขียวที่ถูกดัดแปลงคาเฟอีนออกในการป้องกันความบกพร่องด้านการเรียนรู้และความจำ	30
1.4 การศึกษาผลของชาเขียวและกากชาเขียวต่อระดับการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ	31
1.5 การขออนุมัติทำวิจัยในสัตว์	31
2. ขั้นตอนและวิธีการดำเนินการวิจัย	31
2.1 การเตรียมสารละลายจากชาเขียว และกากชาเขียว	31
2.2 การผ่าตัดเพื่อทำให้เกิดความจำบกพร่อง	31

2.3 การทดสอบทางพฤติกรรม	35
2.3.1 การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดชาเขียวและกากชาเขียวต่อพฤติกรรมการเคลื่อนไหว	35
2.3.2 การทดสอบความสามารถในการเรียนรู้และความจำ	36
2.4 ศึกษาผลของชาเขียวและกากชาเขียว ต่อการทำงานของเอนไซม์ SOD และ GPx	43
2.4.1 การเตรียมเนื้อเยื่อสมอง	43
2.4.2 การวิเคราะห์ค่าการทำงานของเอนไซม์ SOD	44
2.4.3 การวิเคราะห์ค่าการทำงานของเอนไซม์ GPx	45
2.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ	46
2.6 กระบวนการจัดการเกี่ยวกับซากสัตว์	47
ผลการวิจัย	48
1. ผลของชาเขียวและกากชาเขียวเมื่อให้เพียงครั้งเดียวต่อพฤติกรรมการเคลื่อนไหว	48
1.1 ผลต่อจำนวนครั้งการเคลื่อนไหว	48
1.2 ผลต่อความเร็วในการเคลื่อนไหว	50
2. ผลของการให้ชาเขียวและกากชาเขียวต่อการเพิ่มการเรียนรู้และความจำในหนูหนูที่ฉีด $A\beta_{25-35}$ peptides ในโพรงสมอง	52
2.1 ผลการทดสอบโดยใช้วิธี Morris's water maze	52
2.2 ผลการทดสอบโดยใช้วิธี Novel object recognition	56
2.3 ผลการทดสอบโดยใช้วิธี Radial arm maze	58
3. ผลการทดสอบชาเขียวและกากชาเขียวต่อการเพิ่มการเรียนรู้และความจำในหนูหนูที่ถูกฉีด $A\beta_{25-35}$ ที่สมองส่วน Entorhinal cortex	61
3.1 ผลการทดสอบความจำด้วย RAM ในหนูหนูก่อนการผ่าตัด	61
3.2 ผลการทดสอบความจำด้วย RAM ในหนูหนูภายหลังการผ่าตัดชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่อง	63
3.3 ผลการทดสอบความจำด้วย MWM ในหนูหนูก่อนการผ่าตัด	69
3.3.1 เปรียบเทียบเวลาที่หนูหนูแต่ละกลุ่มใช้ในการหาแท่นได้น้ำระหว่างก่อนการผ่าตัดและภายหลังการผ่าตัดเป็นเวลา 10 วัน	70
3.3.2 เปรียบเทียบเวลาที่หนูหนูทดลองใช้ในการหาแท่นได้น้ำภายในกลุ่มระหว่างก่อนการผ่าตัดและภายหลังการผ่าตัดเป็นเวลา 20 วัน	72
3.3.3 Probe Trial Test	73
3.4 ผลการทดสอบความจำด้วยวิธี Novel object recognition	75

4. ผลการทดสอบชาเขียวและกากชาเขียวต่อการเพิ่มการเรียนรู้และความจำในหนูแก่	77
4.1 ผลการทดสอบการเรียนรู้และความจำในหนูแก่ตามธรรมชาติด้วยวิธี RAM	77
4.2 ผลการทดสอบการเรียนรู้และความจำในหนูแก่ตามธรรมชาติ โดยวิธี MWM	79
4.3 Probe Trial Test	80
4.4 ผลการทดสอบความสามารถในการจดจำเกี่ยวกับสิ่งของในหนูแก่ตามธรรมชาติด้วยวิธี Novel Object Recognition	81
5. ผลของสารสกัดชาเขียวและกากชาเขียวต่อการทำงานของเอนไซม์ SOD และ GPx ในหนูหนุ่ม	
5.1 กลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดชาเขียวและกากชาเขียวต่อระดับการทำงานของเอนไซม์ SOD	83
5.2 ผลของสารสกัดชาเขียวและกากชาเขียวต่อระดับการทำงานของเอนไซม์ GPx	85
6. ผลของสารสกัดชาเขียวและกากชาเขียว ต่อการทำงานของเอนไซม์ SOD ในหนูแก่ตามธรรมชาติ	87
7. ผลของชาเขียวและกากชาเขียวที่ถูกดึงคาเฟอีนออกต่อจำนวนครั้งการเคลื่อนไหวและความเร็วในการเคลื่อนไหว	89
8. ผลของชาเขียวและกากชาเขียวที่ถูกดึงคาเฟอีนออกต่อการฟื้นฟูภาวะความจำบกพร่องในหนูถีบจักร	92
8.1 ผลต่อความจำเกี่ยวกับสถานที่	92
8.2 ผลการทดสอบด้วย Novel Object Recognition	94
สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	97
1.ฤทธิ์ของสารสกัดชาเขียวและกากชาเขียวต่อพฤติกรรมเคลื่อนไหว	97
2. ผลของสารสกัดชาเขียวและกากชาเขียวต่อความสามารถในการเรียนรู้และความจำ	97
3. ผลของสารสกัดชาเขียวและกากชาเขียวในการป้องกันภาวะความจำบกพร่องจาก A β ₂₅₋₃₅ peptides	99
4. ผลของสารสกัดชาเขียวและกากชาเขียวต่อการทำงานของเอนไซม์ SOD และ GPx	102
5. ผลของชาเขียวและกากชาเขียวที่ไม่มีคาเฟอีนต่อการเรียนรู้และความจำ	107
6. สรุปและข้อเสนอแนะ	107
บรรณานุกรม	109
ภาคผนวก ก. เอกสารรับรองโครงการวิจัยในสัตว์ทดลองจากคณะกรรมการจริยภาพการใช	
สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยนเรศวร	119
ภาคผนวก ข. เปรียบเทียบโครมาโตแกรมที่ได้จากสารสกัดชาเขียวและกากชาเขียว	120

Execucutive Summary

ชาเขียว (green tea) เป็นเครื่องดื่มที่นิยมบริโภคมากถึงร้อยละ 20 ของชาทั้งหมด ซึ่งนอกจากจะรับประทานโดยปกติแล้ว ยังมีสรรพคุณในการบำบัดโรคหลายชนิด อาทิเช่น โรคซึมเศร้า (Jin et al., 2005) โรคหัวใจขาดเลือด (Peters, et al., 2001; Nakachi, et al., 2000) มะเร็ง (Ahmad and Mukhtar, 1999; Gupta, et al., 2001; Mantena, et al., 2005; Shimizu, et al., 2005) และโรคที่เกิดจากความเสื่อมของเซลล์ประสาท เช่น โรคพาร์กินสันและโรคอัลไซเมอร์ (Mandel and Youdim, 2004) เป็นต้น โดยเชื่อว่าสารสำคัญในชาเขียวที่มีฤทธิ์ในการรักษาเป็นจำพวก polyphenol ซึ่งมีประมาณ 30-42% ในใบชาแห้ง สารพวกนี้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Jin et al, 2005; Nanjo et al, 1999) ลดกระบวนการการเกิด lipid peroxidation (Coimbra et al, 2005) และเสริมฤทธิ์การทำงานของเอนไซม์ glutathione peroxidase, catalase และ quinine reductase (Khan et al, 1992) นอกจากนี้ จากรายงานการศึกษาที่ผ่านมา พบว่าสาร polyphenol ในชาเขียวสามารถลดระดับ malonyldialdehyde (MDA) ซึ่งเป็นสารเกิดจากกระบวนการ lipid peroxidation เมื่อมีการตายของเซลล์ประสาท (Choi et al., 2001) และสามารถเพิ่มการเรียนรู้และความจำเกี่ยวกับสถานที่ ในหนูทดลอง (Haque et al., 2006)

จากการที่ชาเขียวเป็นเครื่องดื่มที่เริ่มมีผู้นิยมมากขึ้น ส่งผลให้ปริมาณของกากชาเขียว (green tea byproduct) ที่เหลือจากการผลิต และต้องถูกกำจัดทิ้งในจำนวนเพิ่มมากขึ้นในแต่ละปีตามไปด้วย สืบเนื่องจากผลการวิเคราะห์เชิงเคมีโดย ศ.ดร.นันทวัน บุญยะประภัศร และคณะ ที่พบว่า กากชาเขียวมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระมากพอๆ กับชาเขียว ทางทีมผู้วิจัยจึงได้ดำเนินโครงการวิจัยเพื่อศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของกากชาเขียว โดยเริ่มจากการตรวจสอบหาขนาดที่มีผลต่อการทำงานของระบบประสาทส่วนกลางในเชิงพฤติกรรมและการเคลื่อนไหว ตามด้วยการทดสอบการส่งเสริมหรือการฟื้นฟูความสามารถในการเรียนรู้และความจำในสัตว์ทดลอง และผลต่อระดับการทำงานของเอนไซม์ SOD และ GPx ในสมองส่วน hippocampus

การทดลองตอนที่หนึ่งเป็นการทดสอบผลของชาเขียวและกากชาเขียว 3 ขนาดความเข้มข้น คือ 3, 30 และ 300 มก./กก. น้ำหนักตัว เมื่อให้เพียงครั้งเดียวต่อพฤติกรรมและการเคลื่อนไหวในหนูถีบจักร เพื่อตรวจสอบขนาดของสารที่มีผลในการกระตุ้นการทำงานของระบบประสาทส่วนกลาง ผลการทดลองพบว่าทั้งชาเขียวและกากชาเขียวที่ขนาดสูงสุดคือ 300 มก./กก. น้ำหนักตัว เท่านั้นที่ส่งผลให้แสดงพฤติกรรมและการเคลื่อนไหวมากขึ้น ส่วนขนาด 3 และ 30 มก./กก. น้ำหนักตัว ไม่มีผลต่อพฤติกรรมและการเคลื่อนไหว

ผลการทดลองในตอนที่สอง เป็นการทดสอบผลของชาเขียวและกากชาเขียว ขนาด 30 และ 300 มก./กก. น้ำหนักตัว เมื่อให้ติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน 3 เดือนต่อการฟื้นฟูภาวะความจำบกพร่องในหนูหนุ่มที่ชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่องโดยฉีด amyloid- β peptides ที่โพรงสมองหรือที่สมองส่วน enthorhinal cortex ผลการทดลองพบว่าหนูความจำบกพร่องที่ได้รับชาเขียวและกากชาเขียวที่ขนาด 300 มก./กก. น้ำหนักตัว มีความจำด้านสถานที่และด้านการจดจำสิ่งของวัตถุดีกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำกลั่น แต่ผลของสารสกัดต่อการฟื้นฟูภาวะความจำบกพร่องเกี่ยวกับความจำอ้างอิงและความจำขณะทำงานยังไม่สามารถสรุปได้ชัดเจน สำหรับในกลุ่มหนูแก่ตามธรรมชาติที่ได้รับชาเขียวและกากชาเขียวขนาด 300 มก./กก. น้ำหนักตัว พบว่ามีความสามารถในการเรียนรู้และความจำอ้างอิง และความจำขณะทำงาน ความจำด้านสถานที่และด้านการจดจำวัตถุสิ่งของ ที่ดีกว่าหนูแก่กลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำอย่างมีนัยสำคัญ

ในการทดลองตอนที่สาม เป็นการวัดระดับการทำงานของเอนไซม์ SOD และ GPx ในสมองส่วน hippocampus ของหนูหนุ่มและหนูแก่ที่ใช้ในการทดลองตอนที่สอง ผลการทดลองพบว่า ในกลุ่มหนูหนุ่มความจำบกพร่องและกลุ่มหนูแก่ที่ได้รับชาเขียวและกากชาเขียวเป็นระยะเวลา 3 เดือน มีค่าระดับการทำงานของเอนไซม์ทั้ง SOD และ GPx ในสมองส่วน hippocampus สูงกว่ากลุ่มหนูหนุ่มปกติ กลุ่มหนูหนุ่มความจำบกพร่องและกลุ่มหนูแก่ที่ได้รับน้ำกลั่นอย่างมีนัยสำคัญ

การทดลองตอนที่สี่ เป็นการทดสอบว่าสารคาเฟอีนในชาเขียวและกากชาเขียว มีผลต่อการฟื้นฟูภาวะความจำบกพร่องหรือไม่ การทดลองส่วนนี้เริ่มจากทดสอบพฤติกรรมเคลื่อนไหวในหนูถีบจักรโดยเปรียบเทียบผลของชาเขียวและกากชาเขียวปกติ ในขนาดความเข้มข้นที่กระตุ้นการทำงานของระบบประสาท กับชาเขียวและกากชาเขียวที่ถูกดึงคาเฟอีนออก ผลการทดลองพบว่าชาเขียวและกากชาเขียวที่ถูกดึงคาเฟอีนออก ที่ขนาดความเข้มข้น 300 มก./กก. น้ำหนักตัว ไม่มีผลในการกระตุ้นการทำงานของระบบประสาท และเมื่อหนูถีบจักรได้รับสารชาเขียวหรือกากชาเขียวที่ถูกดึงคาเฟอีนออกนี้เป็นระยะเวลานาน 4 สัปดาห์และทำให้เกิดภาวะความจำบกพร่อง มีความสามารถในการเรียนรู้และความจำดีกว่าหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำกลั่นอย่างมีนัยสำคัญ

จากผลการทดลองทั้งสี่ตอนอาจสรุปได้ว่า การที่หนูทดลองได้รับสารสกัดกากชาเขียวในขนาด 300 มก./กก. น้ำหนักตัว ติดต่อกันเป็นเวลา 90 วัน สามารถช่วยเพิ่มการเรียนรู้และความจำ และปกป้องภาวะความจำบกพร่องเนื่องจากความชราและผลของโรคอัลไซเมอร์ได้ โดยที่กลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดกากชาเขียว อาจเกี่ยวข้องกับการเพิ่มระดับการทำงานของเอนไซม์ต้าน

อนุมูลอิสระในสมองส่วนhippocampus
ประสาท

มากกว่าเกิดจากสารคาเฟอีนที่มีฤทธิ์ในการกระตุ้น

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดกากชาเขียว (GTB) เปรียบเทียบกับชาเขียว (GT) เมื่อประยุกต์ให้ติดต่อกันทุกวันนาน 3 เดือน ต่อการเรียนรู้และความจำ และการเปลี่ยนแปลงของระดับการทำงานของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) และ glutathione peroxidase (GPx) activity ในสมองส่วน hippocampus ในหนูหนุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่องด้วย amyloid- β peptides (young-A β) และในหนูแก่ตามธรรมชาติ รวมทั้งศึกษาว่าผลการฟื้นฟูความจำนี้เป็นผลจากคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระหรือเป็นผลจากสารคาเฟอีนที่เป็นส่วนประกอบอย่างหนึ่งของชาเขียวและกากชาเขียว

การทดลองในตอนที่มีจุดประสงค์เพื่อทำการตรวจหาขนาดของสารสกัดชาเขียว (GT) และกากชาเขียว (GTB) ที่มีผลกระทบระบบประสาทส่วนกลางในด้านการเพิ่มการเคลื่อนไหว ซึ่งพบว่า เมื่อหนูทดลองได้รับสารสกัดชาเขียวหรือกากชาเขียวเพียงครั้งเดียวในขนาด 3 หรือ 30 มก./กก. น้ำหนักตัว ไม่มีผลต่อพฤติกรรมกรรมการเคลื่อนไหว แต่เมื่อได้รับในขนาด 300 มก./กก. น้ำหนักตัว ทำให้การเคลื่อนไหวเพิ่มมากขึ้นและรวดเร็วขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ

การทดลองตอนที่สอง เป็นการทดสอบผลของชาเขียวและกากชาเขียว ขนาด 30 และ 300 มก./กก. น้ำหนักตัว เมื่อให้ติดต่อกันเป็นระยะเวลา 3 เดือนต่อการฟื้นฟูภาวะความจำบกพร่องในหนูหนุ่มที่ชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่องโดยฉีด amyloid- β peptides และหนูแก่ ผลการทดลองพบว่า หนู young-A β ที่ได้รับชาเขียวและกากชาเขียวที่ขนาด 300 มก./กก. น้ำหนักตัว มีความจำด้านสถานที่และด้านการจดจำสิ่งของวัตถุดีกว่าหนู young-A β กลุ่มควบคุม เมื่อทดสอบโดยใช้วิธี Morris Water Maze test และ Novel Object Recognition test ตามลำดับ แต่ผลในการฟื้นฟูภาวะความจำบกพร่องด้านความจำอ้างอิง และความจำขณะทำงานเมื่อทดสอบโดยใช้วิธี Radial Arm Maze ยังไม่ชัดเจน สำหรับในกลุ่มหนูแก่ตามธรรมชาติที่ได้รับชาเขียวและกากชาเขียว ขนาดความเข้มข้น 300 มก./กก. น้ำหนักตัว มีความสามารถในการเรียนรู้และความจำอ้างอิง และความจำขณะทำงาน ความจำด้านสถานที่และด้านการจดจำวัตถุสิ่งของ ดีกว่าหนูแก่กลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำอย่างมีนัยสำคัญ

การทดลองตอนที่สาม เป็นการวัดระดับการทำงานของเอนไซม์ SOD และ GPx ในสมองส่วน hippocampus ของหนูหนุ่มและหนูแก่ที่ใช้ในการทดลองตอนที่สอง ผลการทดลองพบว่า ในกลุ่มหนู young-A β และกลุ่มหนูแก่ที่ได้รับชาเขียวและกากชาเขียวเป็นระยะเวลา 3 เดือน มีค่า

ระดับการทำงานของเอนไซม์ทั้ง SOD และ GPx ในสมองส่วน hippocampus สูงกว่ากลุ่มหนูหนูปกติ กลุ่มหนูหนูความจำบกพร่องและกลุ่มหนูแก่ที่ได้รับน้ำอย่างมีนัยสำคัญ

การทดลองชุดที่ 4 เป็นการทดสอบว่าสารคาเฟอีนในชาเขียวและกากชาเขียว มีผลต่อการทำงานของระบบประสาทส่วนกลาง หรือไม่ การทดลองส่วนนี้เริ่มจากทดสอบพฤติกรรมเคลื่อนไหวในหนูถีบจักรโดยเปรียบเทียบผลของชาเขียวและกากชาเขียวปกติ ในขนาดความเข้มข้นที่กระตุ้นการทำงานของระบบประสาทส่วนกลาง กับชาเขียวและกากชาเขียวที่ถูกดึงคาเฟอีนออก ผลการทดลองพบว่าชาเขียวและกากชาเขียวที่ถูกดึงคาเฟอีนออก ที่ขนาดความเข้มข้น 300 มก./กก. น้ำหนักตัว ไม่มีผลในการกระตุ้นการทำงานของระบบประสาท และเมื่อหนูถีบจักรได้รับสารชาเขียวหรือกากชาเขียวที่ถูกดึงคาเฟอีนออกนี้เป็นระยะเวลานาน 4 สัปดาห์และทำให้เกิดภาวะความจำบกพร่อง มีความสามารถในการเรียนรู้และความจำดีกว่าหนูกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

สรุปได้ว่าการได้รับสารสกัดกากชาเขียวติดต่อกันเป็นเวลา 90 วัน ด้วยขนาด 300 มก./กก. ช่วยเพิ่มความสามารถในการเรียนรู้และความจำ ในสัตว์ทดลองที่มีอายุมาก และในสัตว์ทดลองที่เป็นแบบจำลองของโรคอัลไซเมอร์ได้ โดยที่การทำงานของชาเขียวและกากชาเขียวอาจเกี่ยวข้องกับการเพิ่มระดับการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในสมองส่วน hippocampus มากกว่าเกิดจากสารคาเฟอีนที่มีฤทธิ์ในการกระตุ้นประสาท

ABSTRACT

The purposes of this study were to investigate the effects of green tea byproduct (GTB) and green tea (GT) extracts on the cognitive functions as well as superoxide dismutase (SOD) and glutathione (GPx) peroxidase activities in the hippocampus of naturally aging rats and amyloid β -induced amnesia rats (young-A β). We also investigated whether animal's memory improvement was due to its antioxidant activities or caffeine, one of constituents found in both GT and GTB extracts.

The first set of experiments was designed to screen the dosages of GT and GTB extract that stimulated the central nervous system (CNS) function, i.e., the motor activity. A single administration of GT or GTB at the dose of 3 or 30 mg/kg b.w. did not affect the animal's locomotor activity. However, both GT and GTB administrations at the dose of 300 mg/kg b.w. could induce significant increases in the number of movements and speed.

The second set of experiments was designed to investigate the memory improving effect of GT and GTB when administered at the doses of 30 and 300 mg/kg b.w./day for 3 months on young-A β and aging rats. The young-A β group that received GT or GTB at the dose of 300 mg/kg b.w. had better memories than the control group by using Morris Water Maze and Novel Object Recognition tests whereas the reference memory test using a Radial Arm Maze was inconclusive. The aging rats received GT or GTB at the dose of 300 mg/kg b.w. also showed a significant improvement of reference, working, spatial, and object-recognitive memories when compared to those of the control group.

The third set of experiments was designed to measure SOD and GPx activities in the hippocampus obtained from the animals used in the second set of experiments. Both young-A β and aging rats that received GT or GTB for 3 months showed significant increases in SOD and GPx activities when compared to the control group.

The forth set of experiments was designed to investigate whether caffeine in GT or GTB had any effects on the memory improvement. The experiment was begun with screening the CNS stimulating doses. The animals received either decaf GT (GT-C) or decaf GTB (GTB-C) at a single dose of 300 mg/kg b.w. showed significantly lower locomotor activities when compared to the GT or GTB group. However, these groups of animals (GT-C and GTB-C) could perform significantly better learning and memory than the control group that received distilled water.

Altogether, we concluded that a 90-day-period of GTB administration could help to restore the cognitive functions in naturally aging rats and could also protect a memory deficit in an animal model of Alzheimer's disease. The actions of GT and GTB may involve the enhancing of antioxidant activity in the hippocampus rather than stimulating action of caffeine.

บททวนวรรณกรรม

1. โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease)

โรคอัลไซเมอร์เป็นโรคสมองเสื่อมประเภทหนึ่ง มักพบในผู้สูงอายุที่มีอายุ 60 ปีขึ้นไป ความชุกของการเกิดโรค (prevalence) จะมากขึ้นตามอายุที่เพิ่มขึ้น ในปี พ.ศ. 2549 ประเทศไทย พบผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ จำนวน 665,287 คน ซึ่งหากแบ่งตามอายุพบว่า อายุ 60-64 ปี พบ 1% อายุ 65-69 ปี พบ 2% อายุ 70-74 ปี พบ 4% อายุ 75-79 ปี พบ 8% อายุ 80-85 ปี พบ 16% และอายุ 86 ปีขึ้นไป พบ 32% ตามลำดับ (สุวิทย์ เดชะวานนท์, 2550) ผู้ป่วยจะมีความสามารถในการเรียนรู้ การคิด และการจำ (cognitive function) ลดลงอย่างช้าๆ และมีการดำเนินของโรคไปอย่างต่อเนื่อง (Stepanichev, et al., 2006; Rivière, et al., 2008)

อาการของโรคอัลไซเมอร์ สามารถแบ่งได้เป็น 3 ระยะ คือ

1. ระยะแรก (early stage) อยู่ในช่วงระยะเวลา 5 ปีแรก มักมีความบกพร่องของความจำระยะสั้น (short term memory) แต่ความจำระยะยาว (long term memory) ยังปกติ มีความสามารถในการทำกิจวัตรประจำวันที่เคยทำลดลง เช่นลืมวิธีการปรุงอาหาร ขับรถ หรือชื่อของการคิดตัดสินใจผิดแปลกไป เช่นเก็บโทรศัพท์มือถือไว้ในตู้เย็น ความสามารถในการใช้ภาษาลดลง เช่นลืมชื่อสิ่งของต่างๆ เกิดการเปลี่ยนแปลงทางด้านอารมณ์ พฤติกรรม และบุคลิกภาพ ลืมวันเวลา สถานที่ มีความบกพร่องในการคิด และการตัดสินใจ

2. ระยะกลาง (middle stage) อยู่ในช่วงระยะเวลา 2-12 ปี ถัดมา มีความบกพร่องของความจำระยะสั้นมากกว่าในระยะแรก และเกิดความบกพร่องของความจำระยะยาว เช่นไม่สามารถจำชื่อตนเอง ชื่อสามี หรือชื่อลูกของตนเองได้ ต้องพึ่งพาผู้อื่นในการทำกิจกรรมในชีวิตประจำวัน เช่นอาบน้ำ หรือแต่งตัว ขาดการคิดตัดสินใจในเรื่องความเหมาะสมหรือความปลอดภัย เช่นไม่ใส่เสื้อกันหนาวในฤดูหนาว ความสามารถในการใช้ภาษาลดลง เช่นไม่สามารถเรียกชื่อสิ่งของง่ายๆ ได้ มีอาการวิตกกังวล (anxiety) หวาดระแวง (suspicious) ไข้โมโห (irritable) ไร้เหตุผล (silly) มีอาการทางจิต (neuropsychiatric) เช่น เห็นภาพหลอน (visual hallucination) สับสนเกี่ยวกับเวลา สถานที่ เช่น ไม่รู้ว่าตนเองอยู่ที่ไหน ไม่รู้ว่าเป็นเวลากลางวันหรือกลางคืน ความสามารถในการคิด การตัดสินใจบกพร่อง ความสามารถในการรับรู้กลิ่นและรสชาติเปลี่ยนแปลงไปทำให้มีความอยากอาหารลดลง เกิดการเปลี่ยนแปลงทางด้านร่างกายเช่น อาจจะมีสูญเสียการควบคุมการทำงานของกระเพาะปัสสาวะและ/หรือลำไส้ รวมทั้งนอนไม่หลับ (insomnia)

3. ระยะสุดท้าย (late stage) อยู่ในช่วงระยะเวลาประมาณ 1-2 ปี สุดท้าย ไม่สามารถจดจำความจำระยะสั้นได้ หรือสามารถจำได้เล็กน้อย ไม่สามารถทำกิจวัตรประจำวันได้เลย หรือทำได้น้อยมาก สูญเสียความสามารถในการคิด การตัดสินใจ พูดสื่อสารไม่ได้ จำคนในครอบครัว หรือภาพตนเองในกระจกไม่ได้ สูญเสียความสามารถในการรับรู้ เกิดการเปลี่ยนแปลงทางด้านร่างกาย เช่น อาจจะไม่สามารถ เคี้ยว กลืน เดิน กลั้นปัสสาวะ และ/หรืออุจจาระได้

โรคอัลไซเมอร์ สามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิดคือ

1. Sporadic Alzheimer's disease หรืออาจเรียกว่า late onset Alzheimer's disease เป็นชนิดที่พบได้ทั่วไป มักพบในผู้ที่มีอายุตั้งแต่ 65 ปีขึ้นไป ยังไม่ทราบสาเหตุชัดเจนแต่เชื่อว่าอาจเกิดจากปัจจัยแวดล้อมต่างๆ จากการศึกษาทางระบาดวิทยาพบว่าผู้ที่มีการศึกษาน้อย ผู้ที่บริโภคอาหารที่มีไขมันและแคลอรีสูง ผู้ที่ไม่ค่อยออกกำลังกาย (sedentary lifestyle) หรือผู้ที่ได้รับบาดเจ็บที่ศีรษะ มีอัตราเสี่ยงต่อการเป็นโรคอัลไซเมอร์สูง (Mattson, 2003; Mayeux, 2003) นอกจากนี้เชื่อว่าอาจเกิดจากปัจจัยทางด้านพันธุกรรม ได้แก่ความผิดปกติของยีน Apolipoprotein E (ApoE) ที่อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 19 ที่ควบคุมการสร้างโปรตีน ApoE ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการขนส่ง phospholipid และ cholesterol พบที่ oligodendroglia พบที่ astrocytes และพบที่ microglia ยีน ApoE มีการแสดงออกของยีน 3 รูปแบบคือ รูปแบบ E₂ รูปแบบ E₃ และรูปแบบ E₄ ทำหน้าที่ในการสร้างโปรตีน ApoE₂ โปรตีน ApoE₃ และ โปรตีน ApoE₄ ตามลำดับ (Parihar and Hemnani, 2004) จากรายงานของ Namba และคณะในปี 1991 พบโปรตีน ApoE อยู่ใน amyloid plaques และ NFT ในสมองของผู้ป่วยที่เป็นโรคอัลไซเมอร์หลังจากเสียชีวิตแล้ว (Namba, et al., 1991) ต่อมา มีรายงานว่า การเพิ่มขึ้นของโปรตีน ApoE₄ ทำให้มีอัตราเสี่ยงของการเกิดโรคอัลไซเมอร์เพิ่มมากขึ้น ในขณะที่การมีโปรตีน ApoE₂ อาจมีส่วนป้องกันไม่ให้เกิดโรคอัลไซเมอร์ (Strittmatter and Roses, 1996; Farrer, et al., 1997; Lendon, et al., 1997) นอกจากนี้จากการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงพบว่าโปรตีน ApoE สามารถจับกับ Aβ peptides ที่อยู่ในรูปแบบที่สามารถละลายน้ำ (soluble Aβ) ซึ่งจะส่งเสริมการก่อตัวของ Aβ peptides ให้เกิดเป็น amyloid plaques (Aβ fibrils) โดยโปรตีน ApoE₄ จะส่งเสริมการก่อตัวของ Aβ peptides ให้เกิดเป็น amyloid plaques ได้ดีกว่าโปรตีน ApoE₃ (Strittmatter, et al., 1993; Wisniewski, et al., 1994; Ma et al., 2002) ปัจจุบันยังไม่ทราบกลไกของยีน ApoE ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคอัลไซเมอร์อย่างชัดเจน

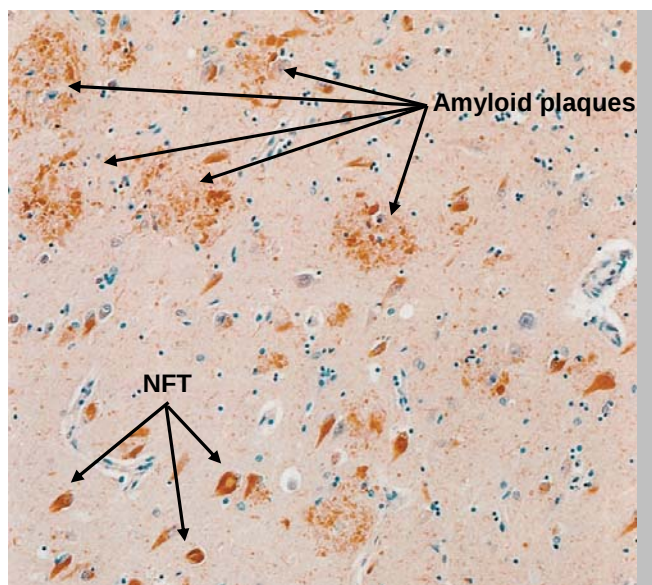
2. Familial Alzheimer's disease อาจพบได้ทั้งผู้ที่มีอายุมากกว่า 65 ปีขึ้นไป (late onset) หรือน้อยกว่า 65 ปี (early onset) พบได้น้อยกว่าชนิดแรก สาเหตุเกิดจากการกลายพันธุ์

ของยีนที่อยู่นบนโครโมโซมคู่ที่ 21 ที่ควบคุมการสร้าง amyloid precursor protein (APP) ซึ่งเป็นโปรตีนที่พบได้บริเวณ cell membrane และผนังด้านในของ endoplasmic reticulum (ER) และ golgi apparatus (Mattson, 2004; Li, et al., 2007) ของเซลล์หลายชนิดรวมทั้งเซลล์ประสาท (Parihar and Hemani, 2004) APP เป็นโปรตีนต้นแบบในการเกิด A β peptides นอกจากนี้โรคอัลไซเมอร์ชนิดนี้อาจเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน presenilin (PS) ที่อยู่นบนโครโมโซมคู่ที่ 1 และ 14 ที่ควบคุมการสร้างโปรตีน PS2 และ PS1 ตามลำดับ โปรตีน PS เป็น integral membrane protein ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของเอนไซม์ γ -secretase ในกระบวนการตัด APP (Ray, Ashall and DPhil, 1998; Saido and Iwata, 2006) โปรตีน PS พบได้ทั่วไปที่เยื่อหุ้มของ nuclear envelop, ER และ golgi apparatus ของเซลล์ประสาท (Kovacs, et al., 1996)

2. พยาธิสรีรวิทยาของโรคอัลไซเมอร์

จากการศึกษาสภาพของเนื้อเยื่อสมองของผู้ป่วยที่เป็นโรคอัลไซเมอร์หลังจากเสียชีวิต (postmortem study) พบพยาธิสภาพ 2 ลักษณะที่เด่นชัดคือ amyloid plaques ซึ่งอยู่ที่ภายนอกเซลล์ และ NFT ซึ่งอยู่ภายในเซลล์ (รูปที่ 1) ของสมองส่วน frontal lobe, parietal lobe occipital lobe และ temporal lobe ซึ่งรวมถึงส่วน hippocampus ด้วย amyloid plaques เกิดจากการเกาะกลุ่มกันของ A β peptides บริเวณรอบเซลล์ประสาทที่ตายแล้ว และรอบเซลล์ค้ำจุนต่างๆ เช่น astrocytes และ microglia เป็นต้น ซึ่ง A β peptides นั้นเกิดจากผลของการตัด APP ซึ่งโครงสร้างของ APP ประกอบด้วยส่วนที่อยู่นอกเซลล์ (hydrophilic amino-terminal extracellular domain หรือ ectodomain) ส่วนที่อยู่ระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์ (hydrophobic putative transmembrane domain หรือ membrane spanning domain) และส่วนที่อยู่ใน cytoplasm (carboxy-terminal cytoplasm domain หรือ cytosolic domain) (Parihar and Hemani, 2004)

หน้าที่ของ APP ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด เชื่อว่าเกี่ยวข้องกับการเจริญของเซลล์ประสาท (neurite outgrowth) ส่วนที่อยู่นอกเซลล์ของ APP สามารถจับกับ proteoglycan ได้หลายชนิดทำให้เกิด cell adhesion หรือ cell interaction ส่วน APP อาจทำหน้าที่เป็น cell-surface receptor ทำให้เกิด synaptic plasticity เป็นต้น

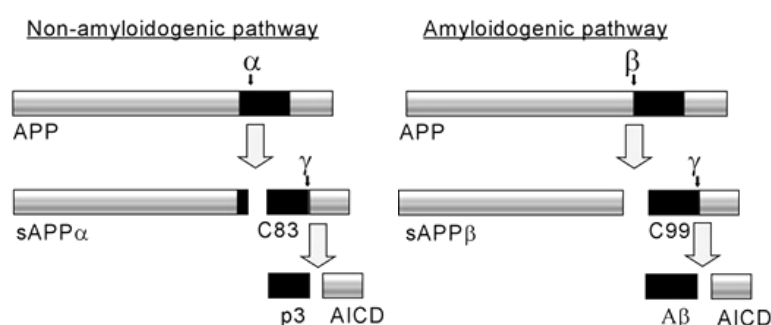


รูปที่ 1 ลักษณะของ amyloid plaques และเซลล์ประสาทที่มี neurofibrillary tangles (NFT) ในเนื้อเยื่อสมองของผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ หลังจากเสียชีวิตแล้ว โดยจะพบ amyloid plaques อยู่ภายนอกเซลล์ประสาท (ลูกศรชี้) เป็นลักษณะของการเกาะกลุ่มกันของ A β peptides และพบ NFT อยู่ภายในเซลล์ประสาท (ลูกศรชี้) ที่เกิดจาก tau protein ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตเข้าไปในโมเลกุลมากกว่าปกติ มีลักษณะคล้ายรูปสามเหลี่ยมดังภาพ (ดัดแปลงจาก Chu, et al., 2000)

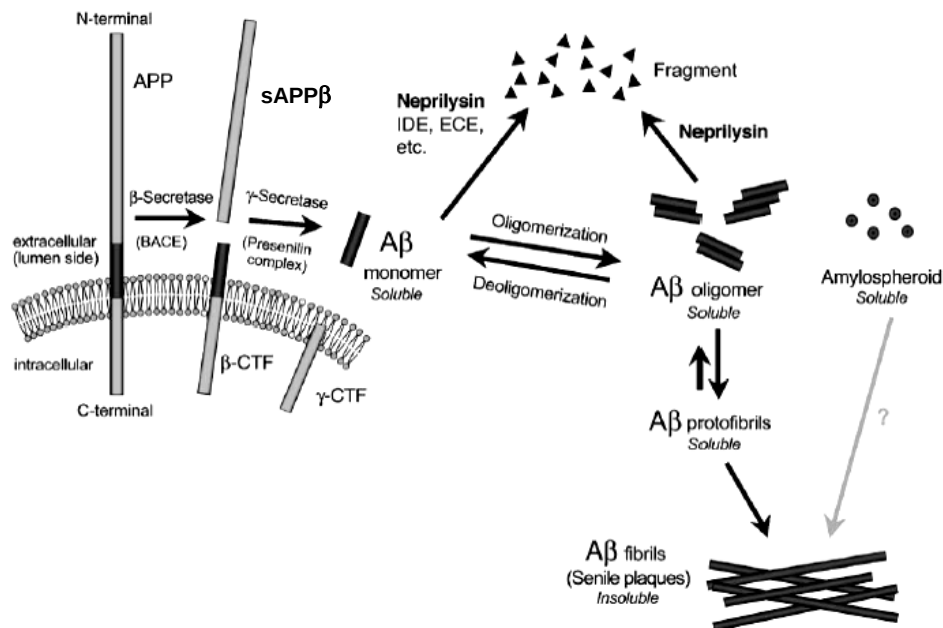
กระบวนการตัด APP อาศัยเอนไซม์ protease 3 ชนิด คือเอนไซม์ α -, β - และ γ -secretase การตัดสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ทิศทางคือ ทิศทางที่ไม่ทำให้เกิดโรค (non-amyloidogenic pathway หรือ α -pathway) และทิศทางที่ทำให้เกิดโรค (amyloidogenic pathway หรือ β -pathway) ทิศทางที่ไม่ทำให้เกิดโรคอาศัยเอนไซม์ α -secretase อาทิเช่นเอนไซม์ prohormone convertase 7 (PC7), tumor necrosis factor- α (TNF- α)-converting enzyme (TACE), a disintegrin and metalloproteinase (ADAM) 9, ADAM-10 หรือ ADAM-17 (Hooper, 2005) ตัด APP ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 687 ทำให้ได้ N-terminal fragment ของ APP ที่ละลายน้ำได้ ที่เกิดจากการตัดของเอนไซม์ α -secretase (soluble amyloid precursor protein α หรือ sAPP α) หลุดออกมานอกเซลล์ประสาท และ C-terminal fragment ที่มีขนาด 83 amino acid (C83) ซึ่งยังคงติดอยู่ระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์ จากนั้นเอนไซม์ γ -secretase ที่ประกอบด้วยโปรตีน 4 ชนิดคือ PS, nicastrin, anterior pharynx defective-1 (Aph-1) และ presenilin enhancer 2 (Pen-2) หรือเรียกว่า presenilin complex (Selkoe and Schenk, 2003) เข้ามาตัด C83 ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 711 หรือ 713 ภายในส่วน membrane spanning domain ทำให้ได้

non-amyloidogenic (P3) และ APP intracellular domain (AICD) ส่วนทิศทางการทำให้เกิดโรคเริ่มจากเอนไซม์ β -secretase (β -amyloid converting enzyme หรือ BACE) เข้ามาตัด APP ที่ปลาย N terminus ของ $A\beta$ domain ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 671 ทำให้ได้ N-terminal fragment ของ APP ที่ละลายน้ำได้ที่เกิดจากการตัดของเอนไซม์ β -secretase (soluble amyloid precursor protein β หรือ sAPP β) หลุดออกมาจากเยื่อหุ้มเซลล์ และ C-terminal fragment ที่มีขนาด 99 amino acid (C99) ติดอยู่ระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์ จากนั้นเอนไซม์ γ -secretase เข้ามาตัด C99 ภายในส่วนของ membrane spanning domain ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 711 หรือ 713 ได้เป็น AICD และ $A\beta$ peptides ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 40 ($A\beta_{1-40}$) หรือ 42 ($A\beta_{1-42}$) ตัว ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 2

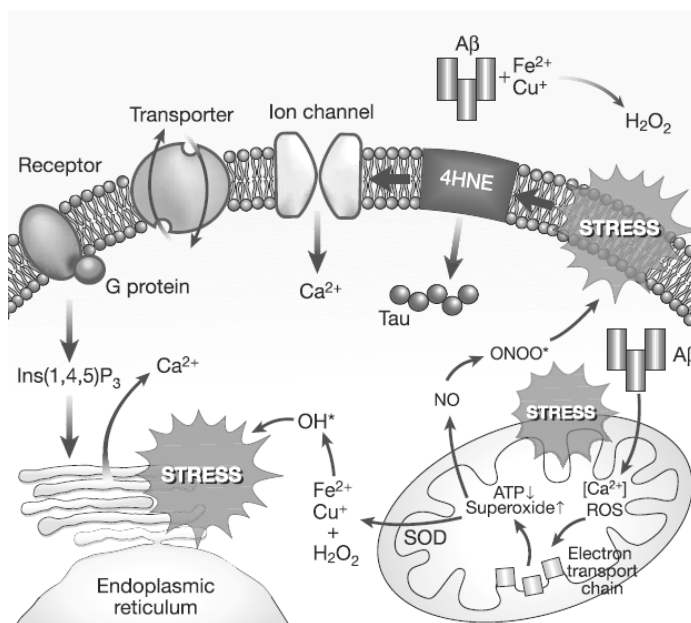
ในภาวะปกติร่างกายจะมีการสร้าง $A\beta$ peptides คือสร้างเป็น $A\beta_{1-40}$ peptides ประมาณร้อยละ 90 และ $A\beta_{1-42}$ peptides ประมาณร้อยละ 10 (Seubert, et al., 1993) และมีกระบวนการทำลาย $A\beta$ peptides ที่ถูกสร้างขึ้นในร่างกาย กระบวนการทำลายเกิดขึ้นโดยอาศัยเอนไซม์ neprilysin, insulin-degrading enzyme (IDE), endothelin-converting enzyme (ECE-1), angiotensin-converting enzyme (ACE) และ plasmin เป็นต้น (Kanemitsu, Tomiyama and Mori, 2003) เอนไซม์เหล่านี้เป็นเอนไซม์ที่ร่างกายสร้างขึ้น เพื่อสร้างสมดุลระหว่างการสร้างและการทำลาย $A\beta$ peptides ภายในสมอง แต่เมื่อไรก็ตามที่เกิดการสูญเสียสมดุลระหว่างการสร้างและการทำลาย $A\beta$ peptides เช่นมีการลดลงของเอนไซม์ที่ใช้ทำลาย $A\beta$ peptides หรือมีการสร้าง $A\beta$ peptides เพิ่มขึ้น จะส่งผลให้มี $A\beta$ peptides เพิ่มมากขึ้น จนเกิดการสะสมเป็น amyloid plaques ในเวลาต่อมา (รูปที่ 3) (Seubert, et al., 1993; Selkoe, 2001)



รูปที่ 2 กระบวนการตัด amyloid precursor protein (APP) ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ทางคือ ทิศทางที่ไม่ทำให้เกิดโรค (non-amyloidogenic pathway หรือ α -pathway) และทิศทางที่ทำให้เกิดโรค (amyloidogenic pathway หรือ β -pathway) (ดัดแปลงจาก Nerelius, et al., 2009)



รูปที่ 3 แสดงการก่อตัวของ A β peptides เป็น amyloid plaques เริ่มจากกระบวนการตัด APP ในทิศทางที่ทำให้เกิดโรค ได้ A β peptides เมื่อเกิดการสูญเสียสมดุลระหว่างการสร้างและการทำลาย A β peptides จะส่งผลให้มี A β peptides เพิ่มขึ้น และเกิดการก่อตัวจากรูปแบบ monomer ไปเป็น oligomer, protofibrils และสุดท้ายเกิดเป็น amyloid plaques (ดัดแปลงจาก Iwata, Higuchi and Saido, 2005)



รูปที่ 4 แสดงกลไกการกระตุ้นการเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทของ A β peptides โดยที่ A β peptides มีความไวต่อการจับกับ Fe $^{2+}$ และ Cu $^{+}$ จึงกระตุ้นให้เกิดการสร้าง H $_2$ O $_2$ ส่งผลกระตุ้นให้เกิดภาวะ lipid peroxidation และเกิด 4HNE ตามมา ซึ่ง 4HNE เป็นสารอัลดีไฮด์ที่เป็นพิษ

สามารถเปลี่ยนแปลงพันธะโควาเลนต์ของโปรตีน นอกจากนี้ $A\beta$ peptides ในเซลล์สามารถกระตุ้นให้เกิดภาวะ oxidative stress ต่อ mitochondria ทำให้รบกวนการควบคุมสมดุลของ Ca^{2+} ภายใน mitochondria กระตุ้นให้เกิดการสร้าง ROS และมีการผลิต ATP ลดลง และเกิดการผลิตอนุมูล O_2^- เพิ่มขึ้น การรบกวนสมดุล Ca^{2+} ทำให้มี Ca^{2+} ภายในเซลล์เพิ่มขึ้น กระตุ้นให้เกิดการสร้าง NO ที่สามารถทำปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วกับอนุมูล O_2^- ที่ถูกผลิตจาก mitochondria ได้เกิดเป็นสารพิษ $ONOO^-$ นอกจากนี้เอนไซม์ SOD จะขจัดอนุมูล O_2^- โดยการเปลี่ยนให้เป็นอนุมูล H_2O_2 และเมื่อทำปฏิกิริยากับ Fe^{2+} และ Cu^+ แล้วจะเกิดเป็นอนุมูล OH^- (Mattson, 2004)

3. การจำลองภาวะโรคอัลไซเมอร์ในสัตว์ทดลองด้วย $A\beta$ เพื่อชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่อง

มีการศึกษาบทบาทของ $A\beta$ peptides ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคอัลไซเมอร์ โดยมีการใช้ $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-42}$ และ $A\beta_{25-35}$ peptides ในการชักนำให้เกิดการบกพร่องของการเรียนรู้และความจำ ในหนูแรทที่ได้รับการฉีด $A\beta_{1-40}$ peptides โดยตรงที่สมองส่วน nucleus basalis เกิดการบกพร่องของพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำระยะยาว (long term memory) โดยมีเปอร์เซ็นต์ในการหลีกเลี่ยงอันตรายที่เกิดจากการถูกช็อตด้วยไฟฟ้า น้อยกว่าหนูกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อทดสอบโดยใช้วิธี passive avoidance (Giovannelli, et al., 1995) และหนูแรทที่ได้รับการฉีดสาร $A\beta_{1-40}$ peptides เข้าทางโพรงสมองพบความบกพร่องของความจำเกี่ยวกับสถานที่ ทั้งความจำอ้างอิง (reference memory) และความจำขณะทำงาน (working memory) โดยมีจำนวนครั้งที่ผิดพลาดในการเข้าไปในแขนเพื่อหาอาหาร (error) มากกว่าหนูกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อทดสอบโดยใช้วิธี radial arm maze (RAM) (Haque, et al., 2008)

สำหรับหนูถีบจักรที่ได้รับ $A\beta_{1-42}$ peptides โดยตรงที่สมองส่วน nucleus basalis magnocellularis (Harkany, et al., 1999) และหนูแรทที่ได้รับการฉีด $A\beta_{1-42}$ peptides เข้าทางโพรงสมอง (Micale, et al., 2006) แสดงความบกพร่องของแสดงพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำระยะยาว โดยมีเปอร์เซ็นต์ในการหลีกเลี่ยงอันตรายที่เกิดจากการถูกช็อตด้วยไฟฟ้า น้อยกว่าหนูกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อทดสอบโดยใช้วิธี passive avoidance (Harkany, et al., 1999; Micale, et al., 2006) และเกิดความบกพร่องของทั้งความจำอ้างอิง และความจำขณะทำงาน โดยมีจำนวนครั้งที่ผิดพลาดในการเข้าไปในแขนเพื่อหาอาหารมากกว่าหนูกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญเมื่อทดสอบโดยใช้วิธี RAM (Micale, et al., 2006) และยังพบว่าหนูแรทที่ได้รับการฉีด

$A\beta_{1-42}$ peptides โดยตรงที่สมองส่วน entorhinal cortex พบความบกพร่องในความสามารถในการจดจำวัตถุสิ่งของ (recognition) โดยใช้ระยะเวลาในการสำรวจสิ่งของสิ่งใหม่น้อยกว่าหนูแรท กลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อทดสอบโดยใช้วิธี Novel Object Recognition และพบความบกพร่องของพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำชนิดที่เกี่ยวกับสถานที่ โดยใช้ระยะเวลาในการหาแท่นได้นานกว่าหนูกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อทดสอบโดยใช้วิธี Morris Water Maze (Sipos, et al., 2007)

นอกเหนือจากการใช้ $A\beta_{1-40}$ และ $A\beta_{1-42}$ peptides ในการชักนำให้เกิดการบกพร่องของการเรียนรู้และความจำแล้ว ยังมีการศึกษาวิจัยทดลองใช้ $A\beta_{25-35}$ peptides ซึ่งเป็นส่วนท้ายของ C-terminal fragment ของ $A\beta_{1-42}$ peptides ที่มีกรดอะมิโน 11 ตัว จัดเป็นส่วนที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาท (neurotoxic domain) (Yamada and Nabeshima, 2000; Pike, et al., 1993) ถึงแม้ว่าจะไม่พบ $A\beta_{25-35}$ ในสมองของผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ แต่ก็สามารถจำลองคุณสมบัติความเป็นพิษและภาวะ oxidative stress ได้เหมือนกับ $A\beta_{1-40}$ และ $A\beta_{1-42}$ peptides จากรายงานของ Maurice และคณะในปี 1998 พบว่าในหนูถีบจักรที่ถูกฉีดด้วย $A\beta_{25-35}$ peptides เข้าทางโพรงสมองเกิดการบกพร่องของพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำระยะสั้น ชนิดที่เกี่ยวกับสถานที่เมื่อทดสอบโดยใช้วิธี spontaneous alternation โดยมีเปอร์เซ็นต์ในการเข้าแขนซ้ำในอุปกรณ์ที่มีลักษณะเหมือนรูปตัว Y หรือเรียกว่า Y-maze มากกว่าหนูถีบจักรในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และเกิดการบกพร่องของพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำระยะยาวเมื่อทดสอบโดยใช้วิธี passive avoidance โดยมีเปอร์เซ็นต์ในการหลีกเลี่ยงอันตรายที่เกิดจากการถูกช็อตด้วยไฟฟ้าน้อยกว่าหนูถีบจักรในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (Maurice, Su and Privat, 1998) ส่วนในหนูขาวที่ถูกฉีด $A\beta_{25-35}$ peptides เข้าทางโพรงสมองพบว่า เกิดการบกพร่องของพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำชนิดที่เกี่ยวกับสถานที่เมื่อทดสอบโดยใช้วิธี MWM โดยใช้ระยะเวลาในการหาแท่นได้นานกว่าหนูขาวกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และจะเห็นความบกพร่องในพฤติกรรมการเรียนรู้อย่างชัดเจนมากขึ้นในหนูขาวที่ได้รับ $A\beta_{25-35}$ peptides ที่อยู่ในรูปของการเกาะกลุ่ม (aggregated form) เมื่อเทียบกับ $A\beta_{25-35}$ peptides ที่ยังไม่อยู่ในรูปของการเกาะกลุ่ม (non-aggregated form) (Delobette, et al., 1997) อีกทั้งยังเกิดความบกพร่องของทั้งความจำอ้างอิง และความจำขณะทำงานเมื่อทดสอบโดยใช้วิธี RAM โดยหนูขาวที่ถูกฉีด $A\beta_{25-35}$ peptides เข้าทางโพรงสมองมีจำนวนครั้งที่ผิดพลาดในการเข้าไปในแขนเพื่อหาอาหาร มากกว่าหนูขาวกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และเกิดความบกพร่องในพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำชนิดที่ไม่เกี่ยวกับสถานที่เมื่อทดสอบโดยใช้วิธี social recognition โดยพบว่าหนูขาวที่ถูกฉีด $A\beta_{25-35}$ peptides ใช้ระยะเวลาใน

การสำรวจสิ่งของสิ่งใหม่น้อยกว่าหนูขาวกลุ่มควบคุมที่ฉีดตัวทำละลายอย่างมีนัยสำคัญ (Stepanichev, et al., 2003)

การฉีด Amyloid β peptides ไปยังสมองส่วน entorhinal cortex หรือโพรงสมอง ทำให้หนูทดลองมีการบกพร่องของความสามารถในการเรียนรู้และความจำได้ถูกใช้เป็น animal model ของโรคอัลไซเมอร์ระยะแรกที่เกิดขึ้นในมนุษย์ เนื่องจากจะมีลักษณะอาการของโรคและลักษณะการเปลี่ยนแปลงของการรับรู้ที่เหมือนกัน (Spowart-Manning and van der Staay, 2005) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าความบกพร่องของความสามารถในการเรียนรู้และความจำที่เกิดจากการชักนำจากการทำให้เกิดพยาธิสภาพของสมองส่วน entorhinal cortex สามารถทำให้อาการดีขึ้นได้จากการใช้ยาที่อาศัยการออกฤทธิ์ผ่าน cholinergic pathway ซึ่งถูกใช้เป็นยาในการรักษาผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์

4. การทดสอบพฤติกรรมที่เกี่ยวข้องกับการเรียนรู้และความจำ

มีการใช้เทคนิคการทดสอบพฤติกรรมในสัตว์ทดลองเพื่อใช้เป็น model ในการศึกษากระบวนการต่างๆ ที่เกิดขึ้นในร่างกายมนุษย์ โดยการทดสอบพฤติกรรมที่นิยมใช้กันอย่างมากในการศึกษาทางสรีรวิทยาระบบประสาท คือ การทดสอบพฤติกรรมที่เกี่ยวข้องกับการเรียนรู้และความจำ การทดสอบมีอยู่หลายวิธีโดยแต่ละวิธีมีความจำเพาะต่อลักษณะของความจำที่แตกต่างกัน อาทิเช่น passive avoidance test, spontaneous alternation test, Morris's Water Maze test, Radial Arm Maze test และ Novel Object Recognition test โดยในการศึกษาวิจัยนี้จะใช้วิธีการทดสอบ ดังนี้

1. ความจำเกี่ยวกับสถานที่ ใช้การทดสอบด้วย Morris's Water Maze test
2. ความจำระยะสั้นและความจำอ้างอิง ใช้การทดสอบด้วย Radial Arm Maze test
3. ความจำในการจำแนกรูปร่าง ลักษณะของวัตถุ ใช้การทดสอบด้วย Novel Object Recognition test

4.1 Morris's Water Maze test

เป็นการทดสอบความจำเกี่ยวกับสถานที่ (spatial memory) ซึ่งเป็นความจำระยะยาว ถูกคิดค้นและเผยแพร่โดย Richard Morris ในปี ค.ศ. 1984 ซึ่งในการทดสอบวิธีนี้ สัตว์ทดลองจะถูกปล่อยให้อยู่ในน้ำเพื่อหาแท่นใต้น้ำในอ่างน้ำทรงกลมขนาดใหญ่โดยอาศัยสัญลักษณ์ที่ติดอยู่ที่ขอบอ่างน้ำหรือ visual cue และวัดความสามารถของการเรียนรู้และความจำโดยการจับเวลาที่

สัตว์ทดลองสามารถหาแท่นได้น้ำเจอ นอกจากนี้ในวันสุดท้ายของการฝึกจะทำการทดสอบ probe trial โดยแบ่งพื้นที่ของอ่างน้ำออกเป็น 4 ส่วนหรือโซนและนำแท่นได้น้ำออกบันทึกระยะเวลาที่สัตว์ทดลองอยู่ในแต่ละโซนเปรียบเทียบกับโซนที่เคยมีแท่นได้น้ำอยู่มาก่อน กระบวนการทดสอบดังกล่าวในสัตว์ทดลองจึงใช้ในการอ้างอิงความสามารถในการเรียนรู้และความจำเกี่ยวกับสถานที่ในมนุษย์ได้ โดยใช้เป็น model ในการใช้ศึกษาเกี่ยวกับโรคความเสื่อมของระบบประสาท (neurodegenerative disease) เช่น โรคอัลไซเมอร์ ซึ่งเป็นโรคที่พบว่ามีอาการลดลงของความสามารถในการเรียนรู้และความจำ มีรายงานว่าความสามารถในการเรียนรู้และความจำเกี่ยวกับสถานที่ที่ทดสอบได้จาก MWM test มีค่าลดลงในผู้ป่วยอัลไซเมอร์ ซึ่งสัมพันธ์กับระดับของความจำเสื่อม (Francis et al., 1999) โดยสมองส่วนที่ทำงานเกี่ยวข้องกับความสามารถเมื่อทดสอบด้วย MWM ประกอบด้วย สมองส่วน hippocampus, striatum, basal forebrain, cerebellum และ neocortex (Rudi and Peter, 2001)

4.2 Radial Arm Maze test

เป็นการทดสอบที่ใช้ทดสอบความจำเกี่ยวกับสถานที่ ใช้ทดสอบได้ทั้งความจำอ้างอิง (Reference memory) และความจำขณะทำงาน (Working memory) ซึ่งเป็นความจำระยะสั้น (short term memory) ถูกคิดค้นและเผยแพร่โดย Olton and Honig ในปี ค.ศ. 1978 โดยในการทดสอบจะทำการฝึกสัตว์ทดลองในการหาอาหารที่วางอยู่ที่ในถ้วยอาหารบริเวณปลายแขนของ RAM ซึ่งมีลักษณะเป็นแขน 8 แขน การทดสอบนี้แบ่งเป็น 3 phase คือ training phase, delay phase และ testing phase โดยในการฝึกช่วง training phase แต่ละครั้งจะสุ่มปิดทางเข้าแขน 4 แขน ดังนั้นสัตว์ทดลองจะสามารถเข้าไปกินอาหารในแขนที่เปิดไว้เพียง 4 แขนเท่านั้น เมื่อสัตว์ทดลองกินอาหารหมดครบทั้ง 4 แขนที่เปิดไว้หรือครบกำหนดเวลาที่ใช้ในการหาอาหาร คือ 5 นาทีแล้วผู้ทดสอบจะนำสัตว์ทดลองไปพักที่กรงเป็นเวลา 5 นาที (delay phase) ในระยะแรกของการฝึก หรือ 50 นาทีในระยะหลังของการฝึก จากนั้นจึงนำสัตว์ทดลองมาทดสอบในช่วง testing phase โดยการเปิดแขนของ RAM ทุกแขนซึ่งจะมีอาหารเฉพาะแขนที่เคยปิดเท่านั้นและให้สัตว์ทดลองหาอาหารโดยผู้ทดสอบจะทำการบันทึกจำนวนครั้งที่สัตว์ทดลองเข้าไปหาอาหารในแต่ละแขนและเมื่อสัตว์ทดลองกินอาหารหมดแล้วหรือครบกำหนดเวลาที่ใช้คือ 5 นาทีจึงนำสัตว์ทดลองกลับเข้ากรง ผู้ทดสอบจะนำข้อมูลการเข้าไปหาอาหารในแขนต่างๆ ที่บันทึกได้มาหา reference memory error (RME) ซึ่งหมายถึงจำนวนครั้งที่สัตว์ทดลองเข้าไปหาอาหารในแขนที่เคยเข้าไปแล้วในช่วง training phase และ working memory error (WME) ซึ่งหมายถึงจำนวนครั้งที่สัตว์ทดลองเข้าไปหาอาหารซ้ำในแขนที่เคยเข้าไปแล้วในช่วง testing phase โดยสมองส่วนที่

ทำงานเกี่ยวข้องกับการทดสอบโดย RAM คือ สมอส่วน hippocampus และสมอส่วนที่เกี่ยวข้องกับ cholinergic pathway โดยพบว่าหากมีการทำลายของสมอส่วน hippocampus (Cassel et al., 1998) หรือ cholinergic nuclei (Stackman and Walsh, 1995) ส่งผลให้เกิดความบกพร่องของความสามารถในการเรียนรู้และความจำที่ทดสอบโดย RAM โดยหนูทดลองที่ทำให้เกิดพยาธิสภาพของสมอส่วน hippocampus, การทำงานที่ลดลงของ cholinergic system และความบกพร่องของความจำสามารถนำมาใช้เป็น animal model ของโรคอัลไซเมอร์ได้ (Walsh and Opello, 1994)

4.3 Novel Object Recognition test

เป็นการทดสอบความสามารถในการเรียนรู้และความจำในการจำแนกรูปร่างลักษณะของวัตถุ ถูกคิดค้นและเผยแพร่โดย Ennaceur and Delacour ในปี ค.ศ.1988 โดยการให้สัตว์ทดลองทำความคุ้นเคยและสำรวจวัตถุ 2 สิ่งที่มีรูปร่างและสีที่แตกต่างกันแต่มีขนาดที่ใกล้เคียงกันในช่วง acquisition phase เป็นเวลา 10 นาที ผู้ทดสอบจะทำการบันทึกระยะเวลาที่สัตว์ทดลองใช้ในการสำรวจวัตถุแต่ละชิ้นหลังจากนั้นจึงนำสัตว์ทดลองไปพักที่กรงเป็นเวลา 10 นาที และนำสัตว์ทดลองมาทดสอบอีกครั้งในช่วง retention phase โดยเปลี่ยนวัตถุชิ้นหนึ่งจาก 2 ชิ้นให้เป็นวัตถุชิ้นใหม่ จากนั้นผู้ทดสอบนำสัตว์ทดลองมาทดสอบอีกครั้ง และทำการบันทึกระยะเวลาที่สัตว์ทดลองใช้ในการสำรวจวัตถุแต่ละชิ้นในช่วง retention phase โดยนำมาคำนวณให้อยู่ในรูปของ recognition index ซึ่งคือการนำระยะเวลาที่สัตว์ทดลองใช้ในการสำรวจวัตถุชิ้นใหม่ (T_C) หารด้วยผลรวมของระยะเวลาที่สัตว์ทดลองใช้ในการสำรวจวัตถุทั้งสองชิ้นในช่วง retention phase ($T_A + T_C$) และคูณด้วย 100% หรือดังสมการ

$$\text{Recognition index} = [T_C / (T_A + T_C)] \times 100$$

โดยที่ T_A เป็นเวลาที่หนูทดลองสำรวจวัตถุชิ้นเก่า ในช่วง retention phase

T_C เป็นเวลาที่หนูทดลองสำรวจวัตถุชิ้นใหม่ ในช่วง retention phase

จากนั้นจึงนำค่า recognition index ที่ได้มาเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม ซึ่งผลในการทดสอบด้วยวิธีนี้นิยมใช้ในการแปลผลอาการความจำบกพร่องภายหลังการชักนำให้เกิดความจำบกพร่องหรือใช้ในการทดสอบผลของยา โดยสมอส่วนที่ทำงานเกี่ยวข้องกับการทดสอบโดย Novel object recognition test คือ สมอส่วน hippocampus และสมอส่วนอื่นๆ ซึ่งประสานงานในการส่งผ่านข้อมูลในส่วนของการรับรู้ลึก (Rosemary, Timothy, and Lisa, 2006)

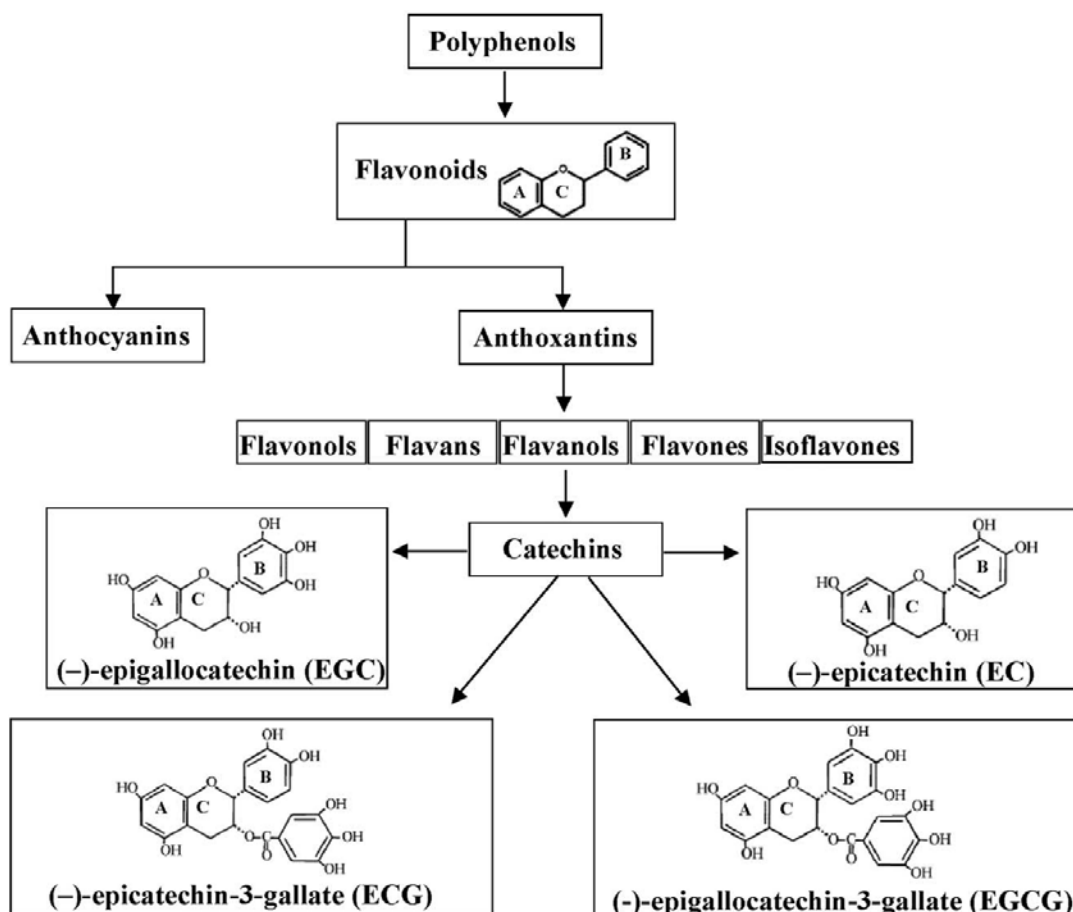
5. ชาเขียว (Green Tea)

เป็นที่ยอมรับโดยทั่วไปว่าน้ำชา (tea) จัดเป็นเครื่องดื่มที่ไม่มีแอลกอฮอล์ที่นิยมมากเป็นอันดับที่สองรองจากน้ำทั่วโลกได้มีการนำใบชามาผลิตและบริโภคปีละประมาณสามพันล้านกิโลกรัม (Khan and Mukhtar, 2007) การแบ่งประเภทของชาตามแบบจีน สามารถแบ่งชาออกได้เป็น 7 ประเภท คือ ชาขาว (white tea) ชาเขียว (green tea) ชาอู่หลง (oolong tea) ชาดำ (black tea) ชาผู่เอ๋อ (pu-er tea) ชาเป่าจิง (pouching) และชาแต่งกลิ่นรส (scented/flavored tea) ซึ่งชาแต่ละประเภคนั้นทำมาจากพืชใน species เดียวกัน คือ *Camellia sinensis* (L.) O Kuntze (รูปที่ 5) ในปัจจุบันชาที่นิยมดื่มโดยทั่วไปมีอยู่ 3 ประเภทคือ ชาเขียว ชาอู่หลง และ ชาดำ โดยชาทั้ง 3 ประเภทนี้มีกระบวนการการผลิตที่แตกต่างกันคือ 1) ชาดำ มีการบริโภคประมาณ 78% ของชาทั้งหมด เป็นชาที่ผ่านการหมัก 100 % (full- fermented tea) มีสารที่สำคัญน้อยมากหรือแทบไม่มีเลย แต่มีลักษณะพิเศษคือ มีกลิ่นหอม 2) ชาอู่หลง มีการบริโภคประมาณ 2% ของชาทั้งหมด เป็นชาที่หมัก (semi-fermented tea) คือผ่านการหมัก 10-80% ชาอู่หลงที่ผ่านการหมักไม่เกิน 20 % ถือว่ามีสารสำคัญที่เป็นประโยชน์ในปริมาณที่ใกล้เคียงกับชาเขียว คุณลักษณะพิเศษของชาอู่หลงคือ มีกลิ่นหอมและชุ่มคอ และ 3) ชาเขียว มีการบริโภคประมาณ 20% ของชาทั้งหมด เป็นชาที่ไม่ผ่านการหมัก (unfermented tea) ผลิตโดยทำใบชาให้แห้งด้วยกรรมวิธีการอบไอน้ำหรืออบที่อุณหภูมิสูงอย่างรวดเร็วเพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยา oxidation ต่อสารกลุ่ม polyphenols และ flavonols ทำให้สารสำคัญเหล่านี้ในใบชายังคงเหลืออยู่ และมีคุณภาพเช่นเดียวกับใบชาสด สีของน้ำชาเป็นสีเขียวอ่อน มีกลิ่นเขียวตามธรรมชาติ (สมพร ภูติยานันต์ 2546)

สาร polyphenols เป็นสารประกอบชีวภาพที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ พบประมาณ 30-42% ในใบชาแห้ง สารในกลุ่มนี้มีอยู่มากมายหลายประเภท รวมถึงสาร flavonoids ที่พบในชาเขียว สำหรับ catechin เป็นสาร flavonoids ชนิดพิเศษที่พบในชา โดยเฉพาะในชาเขียว พบได้ประมาณ 10-18% ในใบชาแห้ง โดย catechin ที่เป็นสารประกอบหลักในชาเขียวมี 5 ชนิดคือ epicatechin (EC), epigallocatechin (EGC), epicatechin gallate (ECG) และ epigallocatechin gallate (EGCG) โดยสาร EGCG พบปริมาณมากที่สุดคือ 40% ของสาร polyphenols ทั้งหมด (รูปที่ 6) สารอื่นๆที่พบในชาเขียวได้แก่ กรด gellotannic, alkaloid, สารกลุ่ม purine ที่เป็นอนุพันธ์ของ methylxanthins ที่สำคัญคือ caffeine, theobromine, theophylline, xanthine, β -carotene, สารคลอโรฟิลล์ โปรตีน น้ำตาล thiamine, วิตามินอี วิตามินซี และ วิตามินบีรวม ฟลูออไรด์ และแทนนิน เป็นต้น (สมพร ภูติยานันต์, 2546; Weinreb et al., 2004, Khan and Mukhtar, 2007)



รูปที่ 5 ลักษณะของต้น ใบ และดอกของชา หรือ *Camellia sinensis* (L.) O Kuntze
(ที่มา: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Koeh-025.jpg>)



รูปที่ 6 แสดงสารประกอบหลักของสาร polyphenols ที่พบในใบชาเขียว (Weinreb et al., 2004)

ในปัจจุบันได้มีการศึกษาวิจัยถึงประโยชน์ของชาเขียวอย่างมากมาย ซึ่งพบว่าสาร polyphenols ในชาเขียวมีความสามารถในการต่อต้านอนุมูลอิสระได้เป็นอย่างดี สามารถเสริมฤทธิ์การทำงานของเอนไซม์ glutathione peroxidase catalase และ quinine reductase ในลำไส้เล็ก ตับ และปอด (Khan, et al., 1992) สาร catechin สามารถกำจัดอนุมูลอิสระ (radical scavenging) เช่นอนุมูล superoxide anion อนุมูล hydroxyl radical 1,1-diphenyl-2picrylhydrazyl radical (Nanjo, et al., 1996) และ nitric oxide ได้ (Nakagawa and Yokozawa, 2002) มีรายงานการศึกษาในคนที่ดื่มชาเขียวขนาด 8.75 กรัม (ชงในน้ำ 1 ลิตร) ทุกวันติดต่อกันนาน 4 สัปดาห์ มีการลดลงของสาร malonyldialdehydy (MDA) และ malonyldialdehydy+4-hydroxy-2(E)-nonenol (MDA+4-HNE) ในเลือดซึ่ง MDA และ MDA+4-HNE นี้เป็นผลผลิตที่เกิดจากกระบวนการ lipid peroxidation (Coimbra, et al., 2006)

มีการศึกษาถึงผลของชาเขียว สาร polyphenols และสาร catechin ทั้ง *in vitro* และ *in vivo* ต่อการป้องกันและรักษาการเกิดมะเร็ง อาทิเช่น มีการศึกษาในโมเดลหนูถีบจักรที่ชักนำให้เป็นมะเร็งต่อมลูกหมาก (transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate (TRAMP) model) เมื่อได้รับสาร polyphenols จากชาเขียวที่ขนาดเทียบเท่ากับคนที่ดื่มชาเขียว 6 ถ้วยต่อวัน สามารถยับยั้งการ development ของเซลล์มะเร็งและเพิ่มระยะเวลาในการอยู่รอดของหนูถีบจักร (Gupta, et al., 2001) และพบว่าในหนูขาวที่ถูกชักนำให้เป็นมะเร็งผิวหนัง (skin cancer) จากรังสี ultraviolet light B (UVB) เมื่อได้รับสาร polyphenols จากชาเขียวที่ขนาด 2 กรัมต่อลิตร ผสมในน้ำดื่มทุกวันเป็นระยะเวลา 24 สัปดาห์ สามารถลดอัตราการเกิด (incidence) การเพิ่มจำนวน (multiplicity) และการเจริญเติบโต (growth) ของก้อนเนื้อ (tumor) ได้ (Mantena, et al., 2005) ผลการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงของมะเร็งลำไส้ใหญ่ (colon cancer) พบว่าเมื่อให้สาร EGCG หรือ catechin ที่ขนาด 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เป็นเวลา 96 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ (Shimizu, et al., 2005) ส่วนในเซลล์เพาะเลี้ยงของมะเร็งเต้านม (breast cancer) พบว่าเมื่อให้สาร EGCG สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วของเซลล์ (proliferation) โดยชักนำให้เกิดการตายของเซลล์ (apoptosis) ได้ (Baliga, et al., 2005)

สำหรับการศึกษาถึงผลของชาเขียวต่อโรคหัวใจ (cardiovascular disease หรือ CVD) ในคนที่มีความเสี่ยงในการเป็นโรคหัวใจพบว่า การดื่มชาเขียว 3 ถ้วยต่อวัน สามารถลดอัตราการเกิดโรคหัวใจขาดเลือด (myocardial Infarction) ได้ถึง 11 เปอร์เซ็นต์ (Peters, et al., 2001) การดื่มชาเขียว 10 ถ้วยต่อวันสามารถลดความเสี่ยงต่อการตายที่เกิดจากโรคหัวใจ (Nakachi, et al. 2000) และการดื่มชาเขียวเป็นประจำทุกวันสามารถลดอัตราการเกิดโรคเส้นเลือดเลี้ยงหัวใจแข็งและหนาตัว (coronary atherosclerosis) นอกจากนี้มีรายงานว่า ในผู้สูงอายุที่มีอายุตั้งแต่ 60 ปีขึ้นไปเมื่อดื่มชาเขียว 5 ถ้วยหรือมากกว่า 800 มล. ต่อวันเป็นเวลา 4 เดือน ความยืดหยุ่นของหลอดเลือดแดง (arterial compliance) มีการปรับตัวดีขึ้นและช่วยเสริมการทำงานของ endothelium ในหลอดเลือด (Murakami and Oshato, 2003)

สำหรับในสัตว์ทดลองการศึกษาถึงผลของชาเขียว หรือสาร catechin ต่อการเรียนรู้และความจำพบว่าในหนูขาวหนุ่มและแก่ธรรมชาติที่ได้รับสารสกัดจากชาเขียวผสมในน้ำดื่มที่ขนาด 0.5 % เป็นเวลาติดต่อกันนาน 8 สัปดาห์ ไม่สามารถช่วยส่งเสริมความจำในหนูขาวหนุ่มได้ แต่สามารถฟื้นฟูการเรียนรู้และความจำในหนูขาวแก่ธรรมชาติโดยมีเปอร์เซ็นต์ในการหลีกเลี่ยงอันตรายที่เกิดจากการถูกช็อตด้วยไฟฟ้ามากกว่าหนูกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อทดสอบโดยใช้วิธี passive avoidance (Kaur, et al., 2008) และในโมเดลหนูถีบจักรที่เร่งให้แก่ (senescence-

accelerated mice หรือ SAM) เมื่อได้รับสาร catechin ผสมในน้ำดื่มที่ขนาด 0.02 % หรือประมาณ 35 มก./กก. น้ำหนักตัว ติดต่อกันนาน 12 เดือน พบว่าสามารถฟื้นฟูการเรียนรู้และความจำโดยมีเปอร์เซ็นต์ในการหลีกเลี่ยงอันตรายที่เกิดจากการถูกช็อตด้วยไฟฟ้ามากกว่าหนูถีบจักรกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อทดสอบโดยใช้วิธี passive avoidance และมีเปอร์เซ็นต์ในการเข้าแขนซ้ายน้อยกว่าหนูถีบจักรในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อทดสอบโดยใช้วิธี Y-maze alternation และยังสามารถช่วยชะลอการปล่อยลิบของสมองได้อีกด้วย (Unno, et al., 2007) ในหนูถีบจักรที่ถูกชักนำให้เกิดความจำบกพร่องโดยใช้สาร scopolamine หากหนูเหล่านี้ได้รับสาร catechin ที่ขนาด 0.2 % เป็นเวลา 2 เดือนสามารถฟื้นฟูการเรียนรู้และความจำเมื่อทดสอบพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำโดยวิธี passive avoidance และ Y-maze alternation ได้ และสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetyl choline esterase (AChE) ได้ (Unno, et al., 2004)

จากงานวิจัยทั้งในหนูขาวหนูหมอปกติที่ได้รับสาร catechin ผสมในน้ำดื่มที่ขนาด 0.1% และ 0.5% (Haque, et al., 2006) และหนูขาวหนูหมอกที่ถูกชักนำให้เกิดความจำบกพร่องด้วย $A\beta_{1-40}$ โดยฉีดเข้าทางโพรงสมองได้รับ catechin ผสมในน้ำดื่มที่ขนาด 0.5% (Haque, et al., 2008) ติดต่อกันเป็นเวลา 26 สัปดาห์ พบว่าสามารถส่งเสริมและฟื้นฟูทั้งความจำอ้างอิง และความจำขณะทำงาน โดยมีจำนวนครั้งที่ผิดพลาดในการเข้าไปในแขนเพื่อหาอาหารน้อยกว่าหนูขาวกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อทดสอบโดยใช้วิธี radial arm maze (RAM) ซึ่งสัมพันธ์กับระดับของ lipid peroxidation ในเลือด และระดับของ ROS ในสมองส่วน hippocampus ที่ลดต่ำลง

การศึกษาถึงผลของสาร EGCG พบว่าหนูถีบจักรที่ได้รับสาร EGCG ฉีดเข้าทางช่องท้องแบบ acute ที่ขนาด 15 และ 60 มก./กก. น้ำหนักตัว มีการเรียนรู้และความจำดีกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญเมื่อทดสอบโดยใช้วิธี passive avoidance (Vignesa, et al., 2006) และสาร EGCG นี้ยังสามารถช่วยฟื้นฟูการเรียนรู้และความจำในโมเดลหนูถีบจักรที่ถูกดัดแปลงพันธุกรรมให้เป็นโรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer transgenic mice) ได้ เมื่อให้สาร EGCG ที่ขนาด 50 มก./กก. น้ำหนักตัวแก่หนูเหล่านี้ทุกวันติดต่อกันเป็นเวลา 6 เดือน ซึ่งสัมพันธ์กับการลดลงของจำนวน amyloid plaques ในสมองส่วน cingulate cortex ส่วน hippocampus และส่วน entorhinal cortex (Rezai-Zadeha, et al., 2008)

6. กาชาเขียว (green tea by-product)

เนื่องจากน้ำชาเป็นเครื่องดื่มที่ได้รับความนิยมมาก ส่งผลให้ใบชาที่นำมาผลิตและบริโภคในแต่ละปีทั่วโลกมีมากถึงประมาณ 3 พันล้าน กก. (Khan and Mukhtar, 2007) ประกอบกับ

ในช่วงระยะไม่กี่ปีที่ผ่านมา มีการเผยแพร่ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับคุณประโยชน์ของชาเขียว อย่างมากมาย ทำให้มีความนิยมในการบริโภคชาเขียวมีเพิ่มมากขึ้น จนปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์ที่มี ส่วนผสมของชาเขียวนอกเหนือจากในรูปของชาชงออกมาสู่ท้องตลาดจำนวนมาก ทำให้มีกากชา เขียวที่เหลือใช้ภายหลังจากการผลิตเครื่องดื่มชาเขียว โดยปกติกากชาเขียวจะถูกจำกัดโดยการ เฝာ หรือการฝังกลบ ซึ่งก่อให้เกิดกระทบผลต่อสิ่งแวดล้อม (Kondo, et al., 2004) มีรายงาน การศึกษาถึงประโยชน์ของกากชาเขียวแต่ยังไม่แพร่หลายมากนัก โดยพบว่ากากชาเขียวมี คุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (Yang, et al., 2003) และเนื่องจากมี องค์ประกอบของโปรตีนที่ยังคงหลงเหลืออยู่เป็นจำนวนมาก จึงเหมาะสมในการพัฒนาเป็นอาหาร เสริมโปรตีนในส่วนประกอบของอาหารสัตว์เพื่อเพิ่มคุณค่าของอาหารสัตว์ (Yang, et al., 2003; Kondo, et al., 2004) การศึกษาเบื้องต้นของ ศ.ดร.นันทวัน บุญยะประสงค์ และคณะ พบว่ากาก ชาเขียวมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระค่อนข้างสูงใกล้เคียงกับชาเขียว และจากการทบทวน วรรณกรรมที่พบว่า สารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นส่วนประกอบในชาเขียว มีฤทธิ์ในการป้องกันหรือ รักษาโรคต่างๆ ได้ ซึ่งรวมถึงโรคความเสื่อมของระบบประสาท ที่เป็นสาเหตุของอาการความจำ เสื่อม เช่นโรคอัลไซเมอร์ จึงเป็นที่น่าสนใจว่า กากชาเขียวที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระนั้น สามารถช่วยป้องกันภาวะความจำบกพร่องในหนูทดลองที่ถูกชักนำให้เกิดความจำบกพร่องด้วย amyloid β peptides หรือฟื้นฟูความสามารถในการเรียนรู้และความจำในหนูแก่ตามธรรมชาติได้ หรือไม่ และผลที่เกิดขึ้นนั้นเกี่ยวข้องกับการเพิ่มขึ้นของเอ็นไซม์ต้านอนุมูลอิสระในสมองส่วนของ hippocampus หรือไม่อย่างไร

วิธีดำเนินการวิจัย

1. สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่นำมาใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ มี 2 ชนิดคือหนูถีบจักร พันธุ์ IRC เพศผู้ อายุ 4 สัปดาห์ และหนูขาวเพศผู้สายพันธุ์ Sprague-Dawley อายุ 8 สัปดาห์ เพื่อใช้เป็นหนูหนูโตเต็มวัย ส่วนหนึ่งของหนูถีบจักรและหนูขาว จะถูกเตรียมเป็นหนูที่แก่ตามธรรมชาติ โดยหนูถีบจักร และหนูขาวจะถูกเลี้ยงจนกระทั่งอายุประมาณ 48 และ 72-80 สัปดาห์ตามลำดับ จึงนำมาใช้ในการศึกษา หนูทุกตัวสั่งซื้อจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ต.ศาลายา จ.นครปฐม และถูกนำไปเลี้ยงไว้ในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองของคณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ภายใต้สภาพแวดล้อมที่มีการควบคุมอุณหภูมิของห้องประมาณ 25 ± 2 องศาเซลเซียส มีระบบการควบคุมแสงสว่างอย่างเหมาะสม ในแต่ละวันกำหนดช่วงเวลาที่เปิดไฟตั้งแต่ 7.00 -19.00 น. หนูทดลองทุกตัวจะได้รับอาหารเม็ดและน้ำสะอาดอย่างบริบูรณ์ (ยกเว้นตอนฝึก Radial Arm Maze ซึ่งมีการให้อาหารแบบจำกัดเพื่อควบคุมน้ำหนักให้ได้ประมาณ 80-85% ของน้ำหนักตัวก่อนฝึก) การเปลี่ยนวัสดุรองนอนนั้นจะเปลี่ยนใหม่วันเว้นวัน หรือเมื่อตรวจพบว่าชื้นแฉะหรือสกปรก หลังจากที่ได้รับหนูจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ หนูทดลองทุกตัวจะต้องได้พักฟื้น และปรับตัวให้คุ้นเคยกับสภาพแวดล้อมใหม่เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ก่อนทำการทดลอง

1.1 การศึกษาผลของสารสกัดชาเขียวและกากชาเขียวต่อพฤติกรรมการเคลื่อนไหว ใช้หนูถีบจักรสายพันธุ์ IRC เพศผู้ น้ำหนักประมาณ 25-30 กรัม จำนวนทั้งหมด 90 ตัว โดยแบ่งหนูทดลองแบบสุ่มเป็น 9 กลุ่มๆ ละ 10 ตัว ดังนี้

ส่วนที่ 1 เป็นการทดสอบผลของชาเขียวและกากชาเขียว

- 1) กลุ่ม Control ได้รับน้ำกลั่นซึ่งเป็นตัวทำละลาย
- 2) กลุ่ม GT 3 ได้รับสารละลายชาเขียว ขนาด 3 มก. /กก. น้ำหนักตัว
- 3) กลุ่ม GT 30 ได้รับสารละลายชาเขียว ขนาด 30 มก. /กก. น้ำหนักตัว
- 4) กลุ่ม GT 300 ได้รับสารละลายชาเขียว ขนาด 300 มก. /กก. น้ำหนักตัว
- 5) กลุ่ม GTB 3 ได้รับสารละลายกากชาเขียว ขนาด 3 มก. /กก. น้ำหนักตัว
- 6) กลุ่ม GTB 30 ได้รับสารละลายกากชาเขียว ขนาด 30 มก. /กก. น้ำหนักตัว
- 7) กลุ่ม GTB 300 ได้รับสารละลายกากชาเขียว ขนาด 300 มก. /กก. น้ำหนักตัว

ส่วนที่ 2 เป็นการทดสอบผลของชาเขียวและกากชาเขียวที่ถูกดั่งสารคาเฟอีนออก

- 8) กลุ่ม GT-C 300 ได้รับชาเขียวที่ถูกดั่งสารคาเฟอีนออก 300 มก./กก. น้ำหนักตัว

9) กลุ่ม GTB-C 300 ได้รับกากชาเขียวที่ถูกดั่งสารคาเฟอีนออก 300 มก. /กก. น้ำหนักตัว

1.2 การศึกษาฤทธิ์ของชาเขียวและกากชาเขียวในการป้องกันความบกพร่องด้านการเรียนรู้และความจำ

การทดลองนี้แบ่งทดสอบในหนู 2 กลุ่มคือหนูหนุ่มโตเต็มวัยและหนูแก่ตามธรรมชาติ ได้ทำการชั่งน้ำหนักตัวหนูทดลองทุกตัว ทุกๆสัปดาห์ จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง

ส่วนที่ 1 การทดสอบในหนูหนุ่มโตเต็มวัย (young adult rats) ใช้หนูแรท อายุประมาณ 8 สัปดาห์ น้ำหนักเริ่มต้น ประมาณ 250-280 กรัม จำนวนทั้งหมด 100 ตัว โดยแบ่งหนูทดลองออกเป็น 2 ชุดตามการฉีด $A\beta_{25-35}$ peptides เพื่อชักนำทำให้หนูเกิดภาวะความจำบกพร่อง โดยชุดที่ 1 ทำการฉีด $A\beta_{25-35}$ peptides ที่โพรงสมองและชุดที่ 2 ทำการฉีด $A\beta_{25-35}$ peptides ที่สมองส่วน enthorhinal cortex

ชุดที่ 1 แบ่งหนูเป็น 6 กลุ่มๆ ละ 10 ตัว ดังนี้

- 1) Control Sham ได้รับน้ำกลั่น และถูกฉีดด้วยน้ำเกลือ (NaCl 0.9 %) ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่ใช้ละลาย $A\beta_{25-35}$ ที่โพรงสมอง
- 2) Control- $A\beta$ ได้รับน้ำกลั่น และถูกฉีดด้วยสารละลาย $A\beta_{25-35}$ ที่โพรงสมอง
- 3) GT30- $A\beta$ ได้รับชาเขียวขนาด 30 มก./กก.ถูกฉีดด้วย $A\beta_{25-35}$ ที่โพรงสมอง
- 4) GT300- $A\beta$ ได้รับชาเขียวขนาด 300 มก./กก.ถูกฉีดด้วย $A\beta_{25-35}$ ที่โพรงสมอง
- 5) GTB30- $A\beta$ ได้รับกากชาเขียวขนาด 30 มก./กก. และถูกฉีดด้วย $A\beta_{25-35}$ ที่โพรงสมอง
- 6) GTB300- $A\beta$ ได้รับกากชาเขียวขนาด 300 มก./กก.และถูกฉีดด้วย $A\beta_{25-35}$ ที่โพรงสมอง

ชุดที่ 2 แบ่งหนูเป็น 4 กลุ่มๆ ละ 10 ตัว ดังนี้

- 1) Control Sham ได้รับน้ำกลั่น และถูกฉีดด้วยน้ำเกลือ (NaCl 0.9 %) ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่ใช้ละลาย $A\beta_{25-35}$ ที่สมองส่วน enthorhinal cortex
- 2) Control- $A\beta$ ได้รับน้ำกลั่น และถูกฉีดด้วยสารละลาย $A\beta_{25-35}$ ที่ enthorhinal cortex
- 3) GT300- $A\beta$ ได้รับชาเขียวขนาด 300 มก./กก. และถูกฉีดด้วย $A\beta_{25-35}$ ที่ enthorhinal cortex
- 4) GTB300- $A\beta$ ได้รับกากชาเขียวขนาด 300 มก./กก. และถูกฉีดด้วย $A\beta_{25-35}$ ที่สมองส่วน enthorhinal cortex

ส่วนที่ 2 การทดสอบในหนูแก่ตามธรรมชาติ (old rats) อายุประมาณ 72-80 สัปดาห์ จำนวน 30 ตัว ทำการทดสอบเฉพาะขนาดสูงสุดของสารชาเขียวและกากชาเขียว โดยแบ่งเป็น 3 กลุ่มย่อย ดังนี้

- 1) กลุ่มควบคุม (Old vehicle) ได้รับน้ำกลั่น
- 2) กลุ่มชาเขียว (Old-GT) ได้รับสารละลายชาเขียว 300 มก./กก.น้ำหนักตัว
- 3) กลุ่มกากชาเขียว (Old-GTB) ได้รับสารละลายกากชาเขียว 300 มก./กก.น้ำหนักตัว

1.3 การศึกษาฤทธิ์ของชาเขียวและกากชาเขียวที่ถูกดั่งคาเฟอีนออกในการป้องกันความบกพร่องด้านการเรียนรู้และความจำ

เนื่องจากปริมาณสารที่ได้มีจำนวนจำกัด การศึกษาส่วนนี้จึงทดสอบหนูถีบจักร สายพันธุ์ ICR และทดสอบผลของสารละลายชาเขียวหรือกากชาเขียวที่ถูกดั่งคาเฟอีนออกเฉพาะขนาด 300 มก./กก.น้ำหนักตัว โดยทำการป้อนหนูทุกวันติดต่อกันเป็นเวลานาน 30 วัน โดยแบ่งหนูหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดความจำบกพร่อง 5 กลุ่ม หนูทดลองแก่ธรรมชาติเป็น 3 กลุ่ม และ ดังนี้

- 1) Young-Veh ได้รับน้ำกลั่น และถูกฉีดด้วยสารละลาย AB_{25-35} ที่สมอง
- 2) Young-GT ได้รับชาเขียวและถูกฉีดด้วยสารละลาย AB_{25-35} ที่สมอง
- 3) Young-GT-C ได้รับชาเขียวที่ถูกดั่งคาเฟอีนและถูกฉีดด้วยสารละลาย AB_{25-35} ที่สมอง
- 4) Young-GTB ได้รับกากชาเขียวและถูกฉีดด้วยสารละลาย AB_{25-35} ที่สมอง
- 5) Young-GTB-C ได้รับกากชาเขียวที่ถูกดั่งคาเฟอีนและถูกฉีดด้วยสารละลาย AB_{25-35} ที่สมอง
- 6) Old-vehicle ได้รับน้ำกลั่น
- 7) Old-GTB 300 ได้รับกากชาเขียว ขนาด 300 มก./กก.น้ำหนักตัว
- 8) Old-GTB-C 300 ได้รับกากชาเขียวที่ถูกดั่งคาเฟอีนออก ขนาด 300 มก./กก.น้ำหนักตัว

1.4 ศึกษาผลของชาเขียวและกากชาเขียวต่อระดับการทำงานของเอนไซม์ด้านอนุมูลอิสระ

ทำการวัดระดับการทำงานของเอนไซม์ SOD และเอนไซม์ GPx ในสมองส่วน hippocampus ของหนูทดลองจากข้อ 1.1 และ 1.2 หลังจากสิ้นสุดการทดสอบพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำ

1.5 การขออนุมัติทำวิจัยในสัตว์

ทุกขั้นตอนของการทดลองได้ดำเนินการตามแนวปฏิบัติของสภาวิจัยแห่งชาติและได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยบรรณการใช้สัตว์ มหาวิทยาลัยนครสวรรค์ เมื่อวันที่ 22 เมษายน พ.ศ. 2551 (เลขที่โครงการ 51 04 0004)

2. ขั้นตอนและวิธีการดำเนินการวิจัย

2.1 การเตรียมสารสกัดหยาบจากชาเขียวและกากชาเขียว

สารสกัดหยาบจากใบชาเขียวและกากชาเขียวที่ใช้ในการทดลองได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ.ดร.นันทวัน บุญยะประสงค์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล สารสกัดดังกล่าวจะผ่านการควบคุมมาตรฐานและการวิเคราะห์หาค่า และตรวจวัดปริมาณของสารสำคัญต่างๆ ซึ่งในกากชาเขียวมีค่าสารต่างๆ คิดเป็น catechin 7.088 % epicatechin (EC) 6.978 % epicatechin gallate (ECG) 4.133 % และ epigallocatechin gallate (EGCG) 5.814 % เป็นต้น (ดูภาคผนวก ข.) ส่วนผงสกัดจากใบชาเขียวและกากชาเขียวที่ถูกดึงคาเฟอีนออก ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.สายลม สัมพันธ์เวชโสภา และอาจารย์ณัฐกาญจน์ รุ่งเรือง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ผงสกัดจากกากชาได้ผ่านการตรวจสอบปริมาณคาเฟอีน (% dry basis) ก่อนและหลังสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม มีค่าคิดเป็น 5.98 และ 2.84 ตามลำดับ ส่วนผงสกัดจากใบชาที่มีปริมาณคาเฟอีนก่อนและหลังสกัดคิดเป็น 2.90 และ 0.68 ตามลำดับ

สารสกัดเหล่านี้ถูกเตรียมให้มีความเข้มข้นขนาด 3, 30 และ 300 มก./กก. น้ำหนักตัวหนูตามลำดับโดยละลายในน้ำบริสุทธิ์ เพื่อป้อนให้หนูโดยตรงทางปากให้ได้ถึงกระเพาะอาหารด้วยปริมาตร 0.2 มล. ในหนูถีบจักร หรือ 0.3 มล. ในหนูแรท การป้อนสารสกัดจะใช้หลอดฉีดยาขนาด 1 มล. และเพิ่มป้อนสารที่มีปลายมนความยาว 10 ซม. (สั่งซื้อจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ) หนูถูกป้อนสารวันละ 1 ครั้งทุกวันเป็นเวลานาน 12 สัปดาห์ (หนูแรท) และนาน 30 วัน (หนูถีบจักร)

2.2 การผ่าตัดเพื่อทำให้หนูเกิดความจำบกพร่อง

2.2.1 การเตรียม Amyloid- β peptide

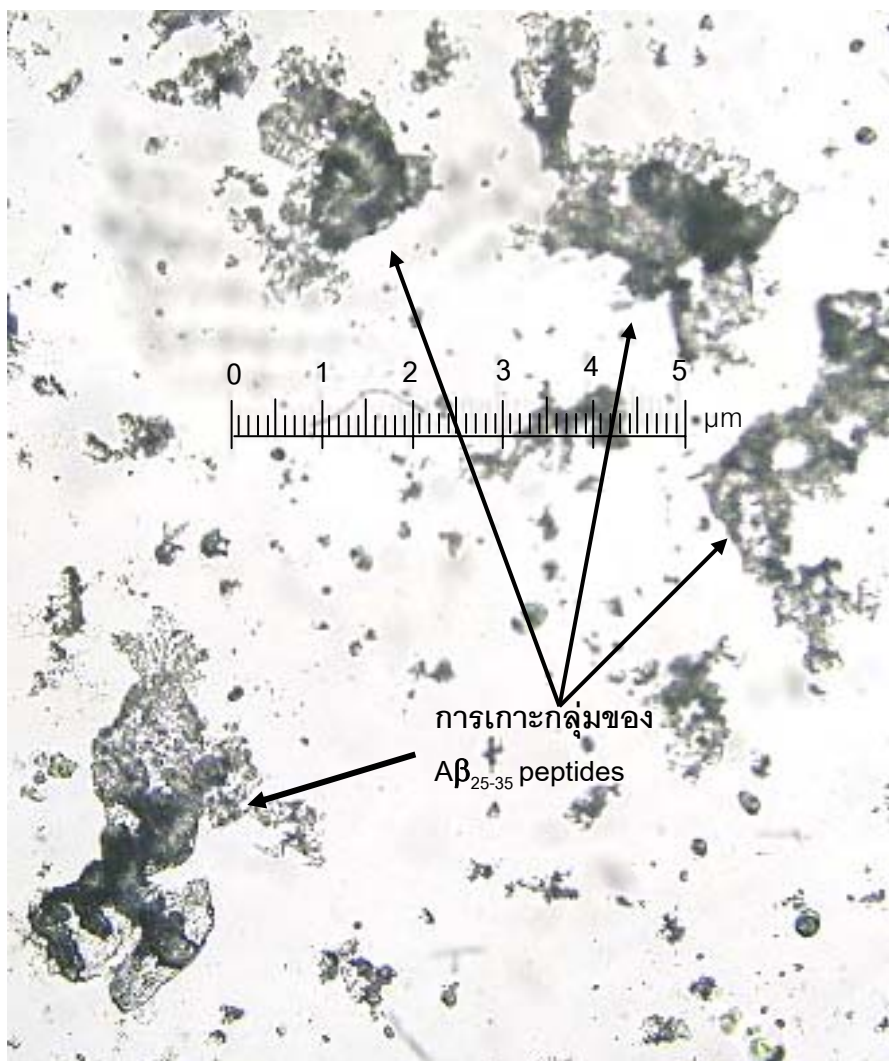
ในการทดลองนี้ใช้สาร amyloid β -protein fragment 25-35 ($A\beta_{25-35}$; Sigma-Aldrich Co.) เพื่อชักนำให้หนูเกิดภาวะความจำบกพร่องโดยนำสาร $A\beta_{25-35}$ มาละลายใน 0.9% normal saline (0.9 % NaCl) ที่ผ่านการกรองด้วย filter membrane ขนาด 0.22 ไมครอนลิตรเตรียมให้มีความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/1 ไมโครลิตร แบ่งเป็นส่วนๆ และเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้ ก่อนนำมาใช้ต้องนำสารละลาย $A\beta_{25-35}$ ที่ได้มา incubate ใน water bath ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมงเพื่อให้สารละลาย $A\beta_{25-35}$ เกิดการเกาะกลุ่ม (รูปที่ 7)

2.2.2 การผ่าตัด (Surgery)

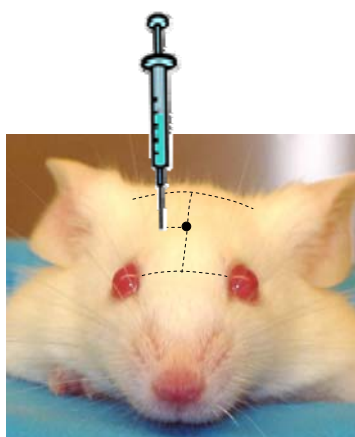
สำหรับกลุ่มหนูแรทหนุ่ม วิธีการผ่าตัดเริ่มจากฉีด atropine sulphate (Union Drug Laboratories Ltd.) ขนาด 0.25 มก./กก. น้ำหนักตัว เข้าใต้ผิวหนัง (subcutaneous) ของหนูทดลอง และสลบหนูทดลองโดยฉีด sodium pentobarbital (CEVA sante animale) ขนาด 50 มก./กก. น้ำหนักตัว เข้าที่ช่องท้อง เมื่อหนูทดลองสลบดีแล้วตัดขนบริเวณศีรษะและยึดตรึงส่วนศีรษะด้วยอุปกรณ์ยึดตรึงกะโหลกศีรษะ (stereotaxic apparatus, model 51603, Stoelting Co. Ltd., USA) (ดังรูปที่ 8 บน) จากนั้นทำความสะอาดและผ่าตัดเปิดหนังศีรษะ (midline incision) ขูดเนื้อเยื่อและพังพืดที่ปกคลุมกะโหลกศีรษะออกให้หมด หาพิกัด bregma ที่กะโหลกศีรษะหนูและเจาะรู โดยใช้ส่วนความเร็วสูง (dental drill) และ ดอกสว่านขนาดเล็ก โดยเจาะรูในจุดแรกบริเวณ พิกัด anteroposterior (AP) = -6.3 มม. และ mediolateral (ML) = $\pm$ 4.0 มม. และจุดที่ 2 บริเวณ AP = -7 มม. และ ML = $\pm$ 4.4 มม. ต่อ bregma (ดัดแปลงจาก Sipos et al., 2007) ทำการเจาะทั้ง 2 ข้างของกะโหลก (bilateral) แล้วทำการฉีดสาร A β_{25-35} peptides ที่ incubate แล้ว (amnesia group) หรือ saline (sham group) ด้วยเข็มขนาด 10 ไมโครลิตร (Hamilton syringe) ปล่อยให้เข็มอยู่บริเวณนั้นนาน 1 นาที ก่อนถอนเข็มออกอย่างช้าๆ ปิดรูด้วย bone wax และใส่ยาฆ่าเชื้อโรคก่อนทำการเย็บปิดแผล ในการฉีดรวม 4 จุด คิดเป็นปริมาตรทั้งหมด 40 ไมโครลิตร

ให้หนูทดลองพักฟื้นเป็นเวลา 10 วัน ก่อนนำมาทำการทดสอบความสามารถในการเรียนรู้และความจำ ด้วย 8-Arm Radial Maze, Morris Water Maze และ Novel Object Recognition test ตามลำดับ

สำหรับกลุ่มหนูถีบจักรที่นำมาทดสอบผลของชาเขียวและกากชาเขียวที่ถูกดองคาเฟอีนออก หนูถีบจักรถูกนำมาสลบด้วย halothane (Rhodia Organique Fine Ltd., USA) ก่อนทำการฉีด A β_{25-35} peptides ที่โพรงสมองด้านขวา (ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อตัว) ด้วยไซริงค์ขนาดเล็ก (microsyring) ที่ต่อกับปลายเข็มเบอร์ 26 G ความยาว 2.4 มิลลิเมตร ตำแหน่งที่ฉีดห่างจากเส้นกึ่งกลาง ไปทางหางตา 1 มิลลิเมตร (รูปที่ 8 ล่าง)



รูปที่ 7 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา แสดงการเกาะกลุ่มกัน (aggregation) ของ $A\beta_{25-35}$ peptide (ลูกศรชี้) ในสารละลาย หลังการ incubation ในอ่างน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชม.



รูปที่ 8 (บน) การตรึงส่วนศีรษะของหนูแรทโดยเครื่องยึดตรึงกะโหลกศีรษะ (stereotaxic apparatus) สำหรับการผ่าตัดสมองเพื่อฉีดน้ำเกลือ หรือ $A\beta_{25-35}$ peptide เข้าที่สมองหนูแรท (ล่างซ้าย) แสดงตำแหน่งที่ปักเข็ม และวิธีการฉีดน้ำเกลือ หรือ $A\beta_{25-35}$ peptide เข้าที่สมองของหนูถีบจักร (ล่างขวา)

2.3 การทดสอบทางพฤติกรรม

2.3.1 การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดชาเขียวและกากชาเขียวต่อพฤติกรรม การเคลื่อนไหว (exploratory behavior)

เครื่องตรวจวัดการพฤติกรรมการเคลื่อนไหวด้วยรังสีอินฟราเรด (Animate model AT-320, MYTES, Japan) โครงสร้างของอุปกรณ์ตรวจวัดนี้มีลักษณะเป็นกล่องพลาสติกทรงกลมคล้ายรูปโดนัท ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 40 ซม. สูง 30 ซม. และมีตัวส่ง-รับอินฟราเรดติดเรียงโดยรอบ เมื่อใส่หนูลงในเครื่องแล้วการเคลื่อนไหวของหนูทดลองจะตัดลำแสงอินฟราเรด สร้างเป็นสัญญาณไฟฟ้าแบบพัลส์ป้อนเข้าสู่หน่วยประมวลผลและแสดงจำนวนการเคลื่อนไหว หนูทดลองที่ทดสอบเป็นหนูถีบจักร การทดลองนี้จะแบ่งหนูออกเป็น 9 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม (ได้รับตัวทำละลาย อย่างเดียว) กับกลุ่มทดสอบที่ได้รับสารละลายชาเขียว กากชาเขียว ชาเขียวที่ถูกดองคาเฟอีน และกากชาเขียวที่ถูกดองคาเฟอีน ที่ขนาดต่างๆกันตามที่ได้กำหนดไว้ การทดสอบเริ่มจากปล่อยหนูทดลองเข้าไปในเครื่องเครื่องละ 1 ตัว แสดงดังรูปที่ 9 ปล่อยให้หนูอยู่ในเครื่องเป็นเวลา 10 นาที ข้อมูลที่ได้ถูกบันทึกเป็น baseline control จากนั้นนำหนูออกมาป้อนน้ำกลั่นหรือสารสกัด ด้วยเข็มป้อนตามขนาดที่กำหนดในแต่ละกลุ่ม และจับหนูเข้าไปในเครื่องเดิมอีกครั้ง บันทึกข้อมูลทุก 10 นาทีเป็นเวลา 60 นาที โดยทำการบันทึกจำนวนครั้งของการเคลื่อนไหว (number of movement) และความเร็วการในการเคลื่อนไหว (speed of movement)

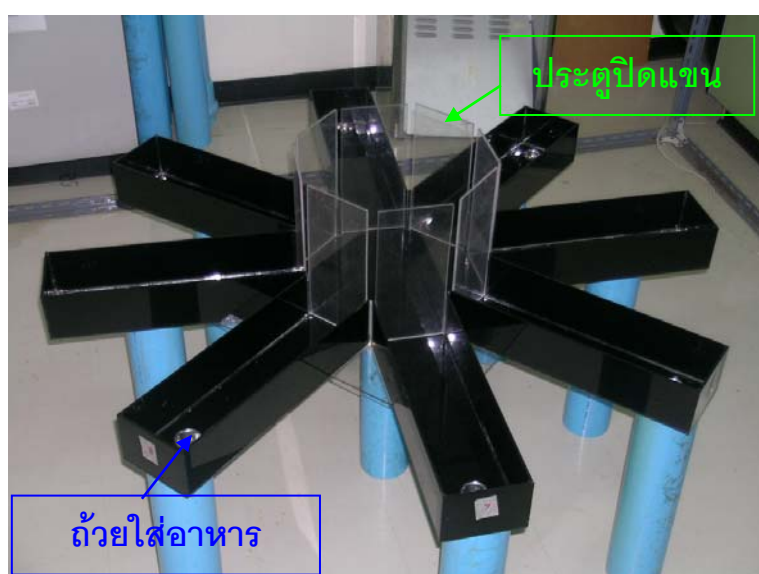


รูปที่ 9 เครื่องตรวจวัดพฤติกรรมการเคลื่อนไหว (Animate model AT-320, MYTES, Japan)

2.3.2 การทดสอบความสามารถในการเรียนรู้และความจำ

วิธีการในการศึกษาวิจัยด้านพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำในสัตว์ทดลองมีหลายวิธีและหลายรูปแบบในโครงการวิจัยนี้ศึกษาโดยใช้คือวิธี Morris's water maze (MWM) วิธี radial arm maze (RAM) วิธี novel object recognition (NOR)

1) Radial Arm Maze (RAM) test วิธีการทดสอบแบบ RAM ได้ถูกคิดค้นและเผยแพร่โดย Olton และ Honig ในปี ค.ศ. 1978 เป็นเทคนิคที่ใช้ทดสอบความสามารถของการเรียนรู้และความจำเกี่ยวกับสถานที่ เป็นการฝึกสัตว์ทดลองที่ถูกเลี้ยงแบบจำกัดอาหารและจะต้องหาอาหารเพื่อความอยู่รอด ใช้ทดสอบได้ทั้งความจำอ้างอิง (reference memory) และความจำขณะทำงาน (working memory) (Olton and Samuelson, 1976; Floresco, Seamans and Phillips, 1997)



รูปที่ 10 แสดงอุปกรณ์ RAM ซึ่งมีลักษณะเป็นทางเดิน 8 แขน และมีประตูปิดแขน (ลูกศรชี้) เพื่อกั้นทางเข้าของแต่ละแขน บริเวณปลายแขนมีถ้วยสำหรับใส่อาหารเม็ด (ลูกศรชี้)

วิธีการฝึกและทดสอบ Radial Arm Maze

หลังจากป้อนสารสกัดเฉพาะให้แก่หนูแรททั้งหนูหนุ่มโตเต็มวัยและหนูแก่ตามธรรมชาติ ของแต่ละกลุ่มเป็นเวลา 3 สัปดาห์ หนูแต่ละตัวได้ถูกนำมาฝึกด้วยอุปกรณ์ Radial Arm Maze (รูปที่ 10) โดยก่อนการเริ่มฝึก หนูจะถูกจำกัดอาหาร (food restriction) ก่อน โดยมีการควบคุมปริมาณอาหารที่ให้แต่ละวัน (ประมาณ

20 กรัม/วัน) ทำให้น้ำหนักตัวลดลง 10 -15 เปอร์เซ็นต์ เพื่อให้เกิดแรงจูงใจในการเดินเข้าเขนเพื่อหาอาหาร

ในวันที่ 1 ของสัปดาห์แรกของการฝึก จะเป็นการทำให้หนูทำความคุ้นเคย (habituation หรือ acclimatization) กับ RAM โดยการเริ่มต้นฝึก วันแรกจะทำการวางอาหารเป็นระยะตามเขนของ RAM เพื่อให้หนูได้เข้าไปสำรวจ (เช่นที่ตามเขนของ RAM 2 เม็ด และภายในถ้วยอาหาร 1 เม็ด) และให้หนูกินอาหารในทุกๆ เขน วันที่สองเป็นต้นไปจะทำการวางอาหารเม็ดเฉพาะบริเวณรอบๆ ถ้วยอาหาร และปล่อยหนูอยู่บน RAM ประมาณ 5-10 นาที

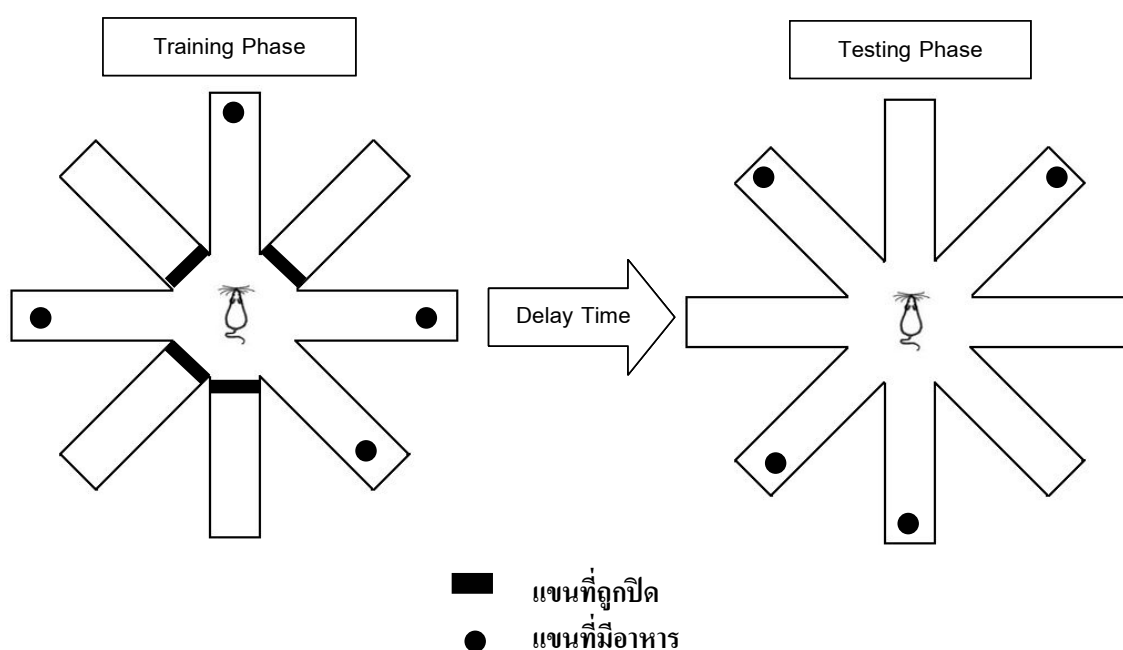
ในวันที่ 2 จะเริ่มทำการฝึกและทดสอบ RAM โดยแบ่งเป็น 3 ระยะ ดังนี้ (รูปที่ 11)

1) Training phase หรือ pre-delay session ใส่อาหารเม็ด 1 เม็ด ลงในถ้วยของทั้ง 8 เขน และเลือกปิดเขน 4 เขน และจะเปลี่ยนแปลงในทุกๆวันแบบสุ่ม (random) จากนั้นวางหนูทดลองบริเวณศูนย์กลางเพื่อให้หนูสำรวจและเดินเข้าไปกินอาหารที่อยู่ปลายเขนทั้ง 4 เขนที่เปิดไว้ จับเวลาที่หนูทดลองใช้ในการกินอาหารทั้ง 4 เขน หรือให้เวลา 5 นาที

2) Delay phase หลังจากทีหนูเข้าไปกินอาหารครบทั้ง 4 เขนที่เปิดไว้แล้ว โดยจะใช้เวลาน้อยกว่าหรือเท่ากับ 5 นาที จากนั้นจะจับหนูออกมาพักในกรงเลี้ยงเป็นเวลา 5 นาที เรียกระยะนี้ว่า Delay phase ซึ่งในช่วงแรกจะพักหนูเป็นเวลานาน 5 นาที (หากหนูสามารถผ่านการทดสอบโดยแสดงความผิดพลาดเพียงครั้งเดียวติดต่อกัน 3 วัน คือ เข้าถูกช่อง 4 ครั้ง ในจำนวน 5 ครั้ง ในครั้งต่อไปจะเพิ่มเวลาพักเป็น 50 นาที) ในช่วงนี้หลังจากนำหนูกลับเข้ากรง ผู้วิจัยจะทำความสะอาดเขนทั้ง 4 ที่เคยเปิดในช่วง Training phase ด้วยน้ำยาทำความสะอาด (แอลกอฮอล์ 70 %) เพื่อลดจุดสังเกตทางกลิ่น (odor cues) ตามทางเดินและผนังด้านข้าง

3) Testing phase หรือ post-delay session ทำการเปิดเขนทุกเขนพร้อมนำหนูทดลองมาวางตรงกลางกับจับเวลา และนับจำนวนครั้งของการผิดพลาด (error) ของหนูทดลอง ซึ่งแบ่งย่อยเป็น 2 ชนิดด้วยกันคือ

1. Reference memory error (RME) คือการที่หนูทดลองเข้าไปในแขนที่ไม่มีอาหารวางอยู่หรืออีกนัยหนึ่งคือเข้าไปในแขนที่เคยเข้าไปกินอาหารแล้วในช่วงของ training phase
2. Working memory error (WME) คือการที่หนูทดลองได้เข้าเข้าไปในแขนที่เคยเข้าไปกินอาหารแล้วในช่วงของ testing phase



รูปที่ 11 แสดงลักษณะของวิธีการทดสอบ RAM ในแต่ละ phase

2) Morris Water Maze Test

การทดสอบพฤติกรรมวิธีนี้ถูกคิดค้นและเผยแพร่โดย Richard Morris ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1981 เป็นเทคนิคที่นิยมทดสอบการเรียนรู้และความจำเกี่ยวกับสถานที่ (spatial memory) ของสัตว์ฟันแทะ (rodent) และมีการนำไปประยุกต์ใช้ในการทดสอบการเรียนรู้และความจำในโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาท เช่น ในหนูทดลองที่ถูกชักนำให้เกิดโรคหลอดเลือดสมอง (stroke) หนูทดลองที่ทำให้เกิดโรคอัลไซเมอร์ หนูแก่ (aged rat) หรือหนูทดลองที่ได้รับสารหรือยา เป็นต้น (D' Hooge and Deyn, 2001; Morris, n.d.)

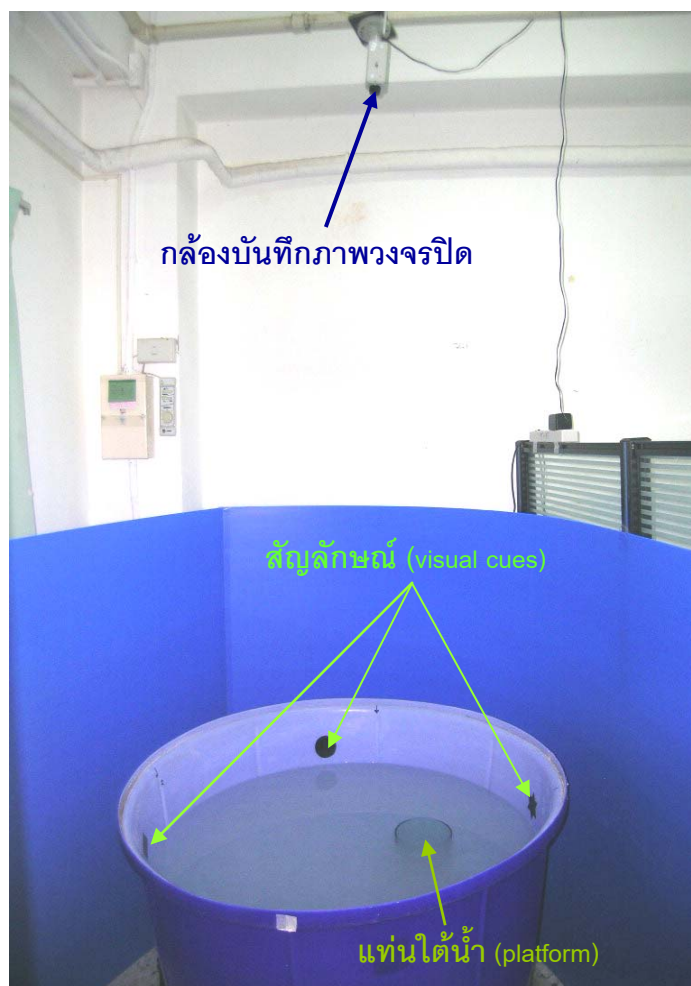
ในการวิจัยนี้ใช้อุปกรณ์ทดสอบ (รูปที่ 12) ประกอบด้วย อ่างน้ำทรงกลม (circular tank) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 120 ซม. และสูง 45 ซม. โดยแบ่ง

ออกเป็น 4 ส่วน (quadrant) ในแต่ละส่วนติดด้วยสัญลักษณ์ (visual cues) ที่มีรูปร่างแตกต่างกัน คือ 1. รูปดาว 2. สีเหลี่ยม 3. ข้าวหลามตัด และ 4. วงกลม เพื่อเป็นเครื่องหมายที่ให้นูททดลองได้สังเกต โดยใส่น้ำที่ควบคุมอุณหภูมิอยู่ที่ 28 ± 1 องศาเซลเซียส ให้มีความลึก 30 ซม. และวางแท่น (platform) ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12.5 ซม. สูง 23 ซม. ให้อยู่ใต้ระดับน้ำประมาณ 1.5-2 ซม. ซึ่งตรงกับส่วนใดส่วนหนึ่งตลอดการฝึกและทดสอบ (Tohda, Tamura and Komatsu, 2003) ในการฝึกและทดสอบของการวิจัยนี้วางแท่นได้น้ำตรงกับสัญลักษณ์ที่ 1 ทำให้น้ำขุ่นด้วยแป้งมันสำปะหลังเพื่อไม่ให้หนูทดลองสังเกตเห็นแท่นได้ และมีการล้างบ่อน้ำที่ภาพวงจรปิดติดตั้งด้านบนของอ่างน้ำโดยจะต่อเชื่อมกับเครื่องคอมพิวเตอร์พีซี (A1150i) และใช้โปรแกรม Pico 2000 สำหรับบันทึกภาพเคลื่อนไหวของหนูทดลองในขณะทำการฝึกและทดสอบ ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ช่วง คือ

1) **ช่วงฝึก (training phase)** ก่อนผ่าตัดผ่าตัดหนูทดลอง ทำการฝึกหนูทดลอง วันละ 1 ครั้ง ทุกวันติดต่อกันเป็นเวลา 7 วัน โดยปล่อยหนูลงที่ตรงกับสัญลักษณ์ที่ 1 และบันทึกเวลาตั้งแต่ปล่อยหนูทดลองจนกระทั่งหนูทดลองค้นหาแท่นได้น้ำเจอ (escape latency) จากนั้นปล่อยให้หนูทดลองอยู่บนแท่นเป็นเวลา 10 วินาที ทำการทดลองซ้ำโดยปล่อยหนูตรงสัญลักษณ์ที่ 2 และ 3 และเว้นระยะเวลาระหว่างการปล่อยแต่ละครั้งประมาณ 5 นาที ถ้าหนูทดลองตัวใดไม่สามารถค้นหาแท่นได้น้ำเจอภายในเวลา 90 วินาที ผู้ทำการทดลองจับให้หนูทดลองอยู่บนแท่น 10 วินาที (Kolb, Cioe and Wendy, 2008)

2) **ช่วงทดสอบ (testing phase)** หลังผ่าตัดหนูทดลองและหนูทดลองพักฟื้นดีแล้วทำการทดสอบ MWM อีกครั้งในวันที่ 20 โดยปฏิบัติเช่นเดียวกับช่วงฝึก และบันทึกระยะเวลาที่หนูทดลองใช้ในการว่ายน้ำหาแท่นได้น้ำเจอ จากนั้นในวันที่ 22 หลังผ่าตัดทำการทดสอบเช่นเดียวกับวิธี MWM แต่นำแท่นได้น้ำออก (probe trial) และแบ่งอ่างน้ำออกเป็น 4 ส่วนคือ zone 1 zone 2 (เป็น zone ที่เคยมีแท่นได้น้ำ) zone 3 และ zone 4 โดยปล่อยหนูทดลองตรงกับสัญลักษณ์ใดสัญลักษณ์หนึ่ง (ในการทดสอบของการวิจัยนี้ปล่อยหนูทดลองตรงกับสัญลักษณ์ที่ 1) และบันทึกระยะเวลาที่หนูทดลองว่ายน้ำอยู่ในแต่ละ zone ของอ่างน้ำ โดยคิดค่าเวลาที่หนูทดลองว่ายน้ำอยู่ในแต่ละ zone เป็นเปอร์เซ็นต์จากเวลาทั้งหมด 90 วินาที (%)

time in each zone) เพื่อทำการทดสอบความสามารถในการจดจำตำแหน่งของ
แท่นได้น้ำ (retention memory)



รูปที่ 12 อุปกรณ์สำหรับทดสอบ MWM สำหรับหนูแรท ประกอบด้วยอ่างน้ำทรงกลม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 120 และลึก 45 ซม. มีสัญลักษณ์ (visual cues) (ลูกศรชี้) ที่มีรูปร่างแตกต่างกันติดในแต่ละส่วนของอ่างน้ำ มีแท่น (platform) (ลูกศรชี้) อยู่ใต้ระดับน้ำประมาณ 1.5-2 ซม. และมีกล้องบันทึกภาพวงจรปิด (ลูกศรชี้) ติดตั้งด้านบนของอ่างน้ำสำหรับบันทึกภาพเคลื่อนไหวของหนูทดลอง

3) การทดสอบ novel object recognition (NOR)

การทดสอบนี้ได้ถูกคิดค้นและเผยแพร่เป็นครั้งแรกโดย Ennaceur และ Delacour ในปี ค.ศ. 1988 ใช้ในการทดสอบความสามารถในการจดจำวัตถุสิ่งของของหนูทดลอง เริ่มจากการให้หนูพบกับวัตถุ 2 ชนิด (ซึ่งหนึ่งในนี้จะนำมาเป็นวัตถุที่คุ้นเคย หรือ familiar object) และปล่อยให้หนูแสดงพฤติกรรมตรวจสอบในช่วงเวลาหนึ่ง แล้วให้พักนาน 10 นาที หลังจากนั้นจึงเริ่มแนะนำวัตถุใหม่ (novel object) แทนที่วัตถุอันเก่าชิ้นหนึ่ง โดยปกติสัตว์ทดลองจะสนใจและสำรวจวัตถุอันใหม่มากกว่าวัตถุอันเก่า (Raber and Benice, 2006) ในการวิจัยนี้ใช้อุปกรณ์ดังแสดงในรูปที่ 13 ซึ่งประกอบด้วยกล่องสี่เหลี่ยมขนาดใหญ่ ขนาดกว้าง 120 ซม. ยาว 120 ซม. และสูง 60 ซม. และวัตถุ 3 ชิ้น คือ วัตถุ A วัตถุ B และ วัตถุ C ที่มีรูปร่าง และสีที่แตกต่างกันแต่มีขนาดที่ใกล้เคียงกัน ทำการทดสอบ NOR วันที่ 24 หลังหนูทดลองได้รับการผ่าตัดโดยแบ่งเป็น 2 ช่วง คือ

1) **ช่วงฝึก (training phase)** ใช้วัตถุ A และ B วางอยู่ตรงกลางของกล่องสี่เหลี่ยมและห่างกันประมาณ 20 ซม. เริ่มการทดสอบโดยนำหนูมาวางตรงกลางระหว่างวัตถุทั้ง 2 ชิ้น และบันทึกเวลาที่หนูทดลองสำรวจและสนใจวัตถุในแต่ละชิ้น โดยมีหลักการคือ หนูทดลองดมวัตถุโดยที่จมูกห่างจากวัตถุไม่เกิน 2 ซม. เลี้ยวหรือสัมผัสกับวัตถุด้วยเท้าหน้าในขณะที่ดมวัตถุอยู่ ส่วนการเดินรอบๆ ปีน เดิน ข้าม นั่ง หรือยืนอยู่บนวัตถุไม่ถือว่าหนูสำรวจและสนใจวัตถุนั้น (Grayson, Idris and Neill, 2007; Sipos, et al., 2007) ใช้เวลาประมาณ 10 นาที จากนั้นนำหนูกลับไปพักที่กรงเลี้ยงเป็นเวลาประมาณ 10 นาที ในระหว่างนี้ผู้วิจัยทำความสะอาดวัตถุทั้ง 2 ชิ้นด้วยแอลกอฮอล์ 70 % และผ้าขนหนูชุบน้ำสะอาด

ค่าดัชนีความชอบวัตถุ (Preference index) ของหนูแต่ละตัวคิดได้จาก

$$\text{Preference index} = [T_A / (T_A + T_B)] \times 100$$

โดยที่ T_A เป็นเวลาที่หนูทดลองสำรวจวัตถุชิ้น A

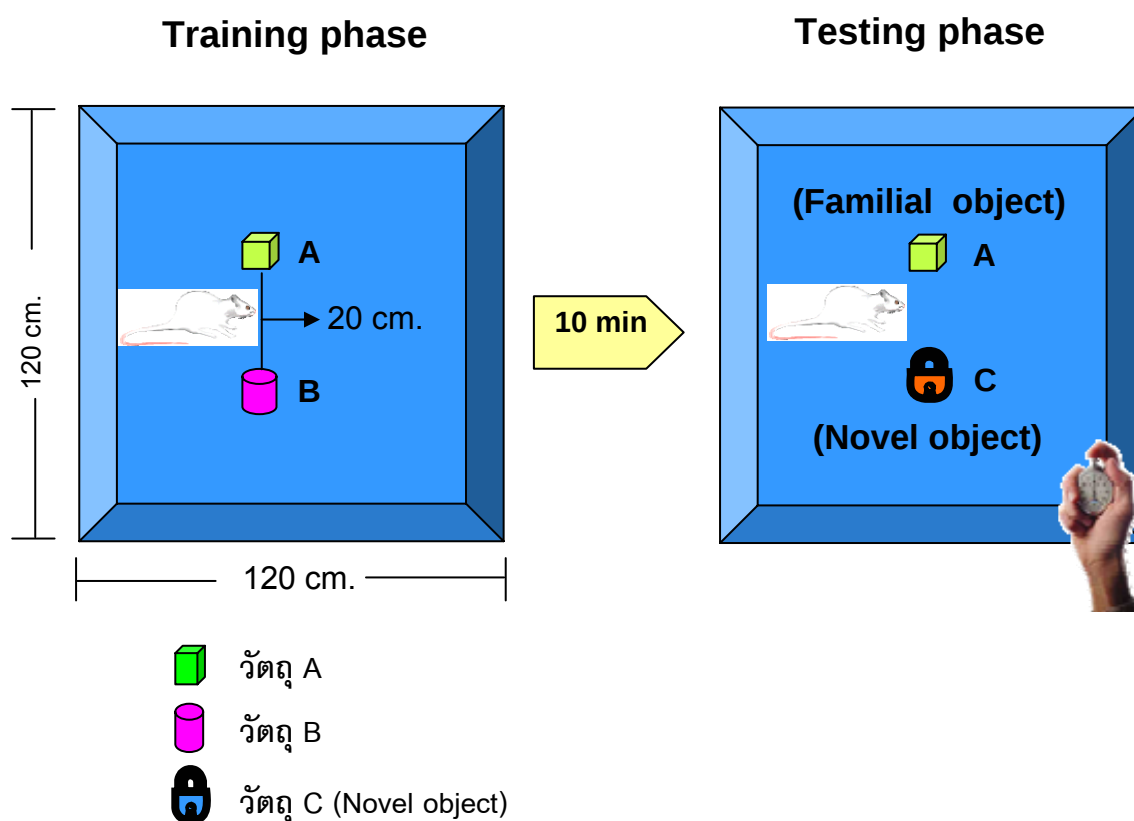
T_B เป็นเวลาที่หนูทดลองสำรวจวัตถุชิ้น B

2) **ช่วงทดสอบ (testing phase)** ปฏิบัติเช่นเดียวกับช่วงฝึกแต่เปลี่ยนวัตถุชิ้นใดชิ้นหนึ่งเป็นวัตถุชิ้นใหม่ (novel object) (เช่น นำวัตถุ A ออกแล้วเปลี่ยนเป็นวัตถุ C หรือ นำวัตถุ B ออกแล้วเปลี่ยนเป็นวัตถุ C) และบันทึกเวลาที่หนูสำรวจและสนใจวัตถุในแต่ละชิ้น การแสดงผลแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ของระยะเวลาในการสำรวจวัตถุโดยคำนวณจากสูตรหาดัชนีความจำ (recognition index)

$$\text{Recognition index} = [T_C / (T_A + T_C)] \times 100$$

โดยที่ T_A เป็นเวลาที่หนูทดลองสำรวจวัตถุชิ้น A ในช่วง testing phase

T_C เป็นเวลาที่หนูทดลองสำรวจวัตถุชิ้น C ในช่วง testing phase



รูปที่ 13 Diagram แสดงการทดสอบ novel object recognition (NOR) ประกอบด้วยกล่องสี่เหลี่ยมขนาดใหญ่ขนาดกว้าง 120 ซม. ยาว 120 ซม. และสูง 60 ซม. และวัตถุ 3 ชิ้น คือ วัตถุ A วัตถุ B และ วัตถุ C ที่มีรูปร่าง และสีที่แตกต่างกันแต่มีขนาดที่ใกล้เคียงกัน ในการทดสอบแบ่งเป็น 2 ช่วง คือ ช่วงฝึก (training phase) ให้หนูสำรวจวัตถุ 2 ชิ้น คือ วัตถุ A และ B ส่วนช่วงทดสอบ (testing phase) ให้หนูสำรวจวัตถุ 2 ชิ้น โดยเปลี่ยนวัตถุ 1 ชิ้นเป็นวัตถุใหม่ (novel object) คือ เปลี่ยนจากวัตถุ B เป็น C

2.4 ศึกษาผลของซาเขียวและกากซาเขียว ต่อการทำงานของเอนไซม์ SOD และ GPx

ในการศึกษาวิจัยนี้ทำการวัดค่าระดับการทำงานของเอนไซม์ SOD และ GPx ในสมองส่วน hippocampus ของหนูทดลองหนุ่ม และค่าระดับการทำงานของเอนไซม์ SOD ในสมองส่วน hippocampus และ cortex ของหนูทดลองแก่ธรรมชาติหลังจากสิ้นสุดการทดสอบพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำ

2.4.1 การเตรียมเนื้อเยื่อสมอง

เมื่อทำการทดสอบพฤติกรรมเสร็จสิ้นแล้วในวันถัดมาหนูทดลองถูกฆ่าเพื่อทำการแยกส่วนของสมองมาทำการวิเคราะห์ค่าระดับการทำงานของเอนไซม์ SOD และ GPx โดยหนูทดลองถูกฉีดด้วยยาสลบ urethane ขนาด 2 กรัม /กก. น้ำหนักตัว เข้าทางช่องท้อง จากนั้นจึงทำการตัดศีรษะด้วยเครื่องตัดศีรษะ (decapitators) เลาะเอาสมองออกมาแยกส่วนโดยจะเก็บเฉพาะสมองส่วน hippocampus และชั่งน้ำหนักก่อนนำไปใส่ในหลอดสำหรับปั่นเหวี่ยง (centrifuge tube) ขนาด 15 มล. และเติม phosphate buffer ที่อัตราส่วน 5 มล. ต่อชิ้นส่วนของสมอง 2 กรัม จากนั้นทำการปั่นด้วยเครื่องปั่นที่ความเร็วระดับ 5 เป็นเวลานานประมาณ 3 นาที หรือจนเห็นว่าเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 3,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บน้ำสมองที่เป็นของเหลวลอยอยู่ส่วนบน (supernatants) เพื่อนำไปวิเคราะห์ค่าการทำงานของเอนไซม์ SOD และ GPx หรือนำน้ำสมองไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการวิเคราะห์ต่อไป

2.4.2 การวิเคราะห์ค่าการทำงานของเอนไซม์ SOD

ใช้ชุดวิเคราะห์ค่าการทำงานของเอนไซม์ SOD โดยมีหลักการคือ เอนไซม์ xanthine oxidase ร่วมกับออกซิเจน กระตุ้นการเปลี่ยน hypoxanthine ไปเป็น xanthine ส่งผลให้เกิด O_2^- และกระตุ้นการเปลี่ยน xanthine ไปเป็น uric acid และน้ำ (H_2O) ส่งผลให้เกิด O_2^- และทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงของ tetrazolium salt ที่เป็นตัวจับ (detector) ของ O_2^- ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร โดยมีวิธีการทดสอบและวิธีการคำนวณหาค่าการทำงานของเอนไซม์ดังนี้

การทดสอบค่าการทำงานของเอนไซม์ SOD

ใช้ถาดที่มี 96 หลุม และทำซ้ำ 2 ครั้ง (duplicate) โดยเริ่มจาก 1) เติม 1X SOD buffer ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงในหลุม control 2) เติม SOD Standard ที่มีความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5 และ 10 ยูนิท/25ไมโครลิตร ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงในหลุมของ standard ในแต่ละความเข้มข้น 3) เติม sample ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงในหลุม sample 4) เติม master mix ที่มีส่วนประกอบของสาร 10X SOD buffer สาร WST-1 reagent และเอนไซม์ xanthine oxidase ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ลงในทุกหลุม 5) เติม 1x xanthine ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงในทุกหลุม รวมปริมาตรในแต่ละหลุมเท่ากับ 200 ไมโครลิตร นำมา incubate ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที เขย่า (mix) บนเครื่องอ่านค่าการดูดกลืนแสง 10 วินาที และนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร (หรือ ΔA_{450})

วิธีการคำนวณหาการทำงานของเอนไซม์ SOD นำค่าการดูดกลืนแสงที่

ได้มาคำนวณหาค่า SOD activity โดยคำนวณจากสูตร

$$\text{SOD Activity (U/ml)} = \left(\left(\frac{\text{Sample LR} - \text{y-intercept}}{\text{slope}} \right) \times \frac{0.23 \text{ ml}}{0.01 \text{ ml}} \right) \times \text{sample dilution}$$

โดยค่า LR (linearized rate) คำนวณจากสูตร

$$\text{LR} = \frac{\text{ค่าดูดกลืนแสงของ standard A}}{\text{ค่าดูดกลืนแสงของ standard A หรือ standard อื่นๆ หรือ samples}}$$

นำค่า LR และ final SOD activity ของ SOD standards มา plot เป็นกราฟ typical standard curve และนำค่าที่ได้จากสมการเส้นตรงของกราฟไปแทนค่าในสูตรเพื่อคำนวณหาค่า SOD activity (Units/ml)

ตารางที่ 1 สรุปขั้นตอนการทดสอบหาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ SOD

หลุม	เติมสารปริมาตร (μl)				
	1x SOD buffer	standard	sample	Master Mix	1x Xanthine
Control	25	-	-	150	25
standard		25	-	150	25
sample			25	150	25

2.4.3 การวิเคราะห์ค่าการทำงานของเอนไซม์ GPx

ใช้ชุดวิเคราะห์ค่าการทำงานของเอนไซม์ GPx โดยมีหลักการคือ เอนไซม์ GPx ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยารีดักชันของ สารประกอบ hydrogen peroxide ได้แก่ lipid peroxide (ROOH) และ H_2O_2 โดยมี glutathione (GSH) ร่วมในปฏิกิริยา เกิดเป็น oxidized glutathione (GSSH) และ H_2O จากนั้นเอนไซม์ glutathione reductase (GR) จะเร่งปฏิกิริยารีดักชันของ GSSH โดยมี nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) ร่วมในปฏิกิริยา เกิดเป็น GSH และ $NADP^+$ และทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงของ $NADP^+$ ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร โดยมีวิธีการทดสอบและวิธีการคำนวณหาค่าการทำงานของเอนไซม์ GPx ดังนี้

วิธีการทดสอบค่าการทำงานของเอนไซม์ GPx การทดสอบค่าการทำงานของเอนไซม์ GPx จะใช้ภาชนะที่มี 96 หลุม และทำซ้ำ 2 ครั้ง (duplicate) โดยเริ่มจาก 1) เติม buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในหลุม blank ปริมาตร 160 ไมโครลิตร ลงในหลุมควบคุม control (ซึ่งถือเป็น background) ปริมาตร 140 ไมโครลิตร ลงในหลุม standard และหลุม sample 2) เติม reaction mix ที่มีส่วนประกอบของ GR GSH และ NADPH ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในหลุม control หลุม standard และหลุม sample 3) เติม เอนไซม์ GPx ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในหลุม standard 4) เติม sample ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในหลุม sample และ 5) เติม cumene hydroperoxide ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในหลุม control หลุม standard และหลุม sample รวมปริมาตรในแต่ละหลุมเท่ากับ 200 ไมโครลิตร นำไปเขย่าบนเครื่องอ่านค่าการดูดกลืนแสง 10 วินาที และอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร (ΔA_{340}) ทุกๆ 1 นาที เป็นเวลาทั้งหมด 10 นาที

วิธีการคำนวณหาค่าการทำงานของเอนไซม์ GPx คือนำ ΔA_{340} ที่ได้ไปคำนวณหาค่าการดูดกลืนแสงต่อนาที (หรือเรียกว่า $\Delta A_{340}/\text{min.}$) จากสูตร

$$\Delta A_{340}/\text{min.} = \frac{\Delta A_{340} (\text{Time 2}) - \Delta A_{340} (\text{Time 1})}{\text{Time 2 min.} - \text{Time 1 min.}}$$

จากนั้นนำค่า $\Delta A_{340}/\text{min.}$ (ที่ได้จากสูตรข้างต้น) ของ sample และ standard ลบออกด้วยค่า $\Delta A_{340}/\text{min.}$ ของ background และนำผลลัพธ์ $\Delta A_{340}/\text{min.}$ ของ sample ที่ได้มาคำนวณหาค่าการทำงานของเอนไซม์ GPx (GPx activity) ดังสูตรต่อไปนี้

$$\text{GPx activity} = \frac{\Delta A_{340}/\text{min.}}{0.00379 \mu\text{M}^{-1}} \times \frac{0.2 \text{ ml}}{0.02 \text{ ml}} \times \text{sample dilution} = \text{nmol/min/ml} = \text{Units/ml}$$

ตารางที่ 2 สรุปขั้นตอนการทดสอบหาค่าระดับการทำงานของเอนไซม์ GPx

กลุ่ม	เติมสารปริมาตร (μl)				
	Buffer	Reaction mix	GPx	sample	cumene hydroperoxide
blank	200	-	-	-	-
control (background)	160	20	-	-	20
standard	140	20	20	-	20
sample	140	20	-	20	20

2.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้จากการทดสอบพฤติกรรมโดยคำนวณจากจำนวนครั้งที่ผิดพลาดเมื่อทดสอบพฤติกรรมด้วยวิธี RAM ระยะเวลาที่หนูทดลองใช้ในการหาแท่นได้น้ำเมื่อทดสอบพฤติกรรมด้วยวิธี MWM และระยะเวลาที่หนูทดลองสำรวจและสนใจวัตถุแต่ละชิ้นเมื่อทดสอบพฤติกรรมด้วยวิธี NOR และข้อมูลที่ได้จากการวัดค่าระดับเอนไซม์ แสดงเป็นค่าเฉลี่ย (mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (standard error of the mean หรือเรียกว่า S.E.M.) เปรียบเทียบความแตกต่างภายในกลุ่มโดยใช้ Student's *t*-test ในการทดสอบพฤติกรรม MWM และ NOR และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มโดยใช้ repeated measures one-way analysis of variance (ANOVA) ตามด้วย Dunnett's pos hoc test ในการทดสอบพฤติกรรม RAM โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติที่ใช้คือ SigmaStat version 3.0 (SPSS Inc., USA) โดยค่า $P < 0.05$ ถือว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

2.6 กระบวนการจัดการเกี่ยวกับซากสัตว์

เมื่อสิ้นสุดการทดสอบทางด้านพฤติกรรมแล้ว หนูทุกตัวจะถูกทำสลบโดยการฉีด Nembutal ขนาด 50 มก./กก. น้ำหนักตัว เข้าที่ช่องท้อง เมื่อหนูสลบดีแล้วจึงนำมาตัดคอด้วยเครื่อง decapitator (Harvard Apparatus, USA) ซากหนูทดลองทุกตัวจะถูกนำไปใส่ในถุงอย่างมิดชิดและนำไปเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง ณ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อบริการรวบรวมนำไปกำจัดด้วยวิธีการฝังกลบต่อไป

ผลการวิจัย

1. ผลของชาเขียวและกากชาเขียวเมื่อให้เพียงครั้งเดียวต่อพฤติกรรมการเคลื่อนไหว

1.1 ผลต่อจำนวนครั้งการเคลื่อนไหว

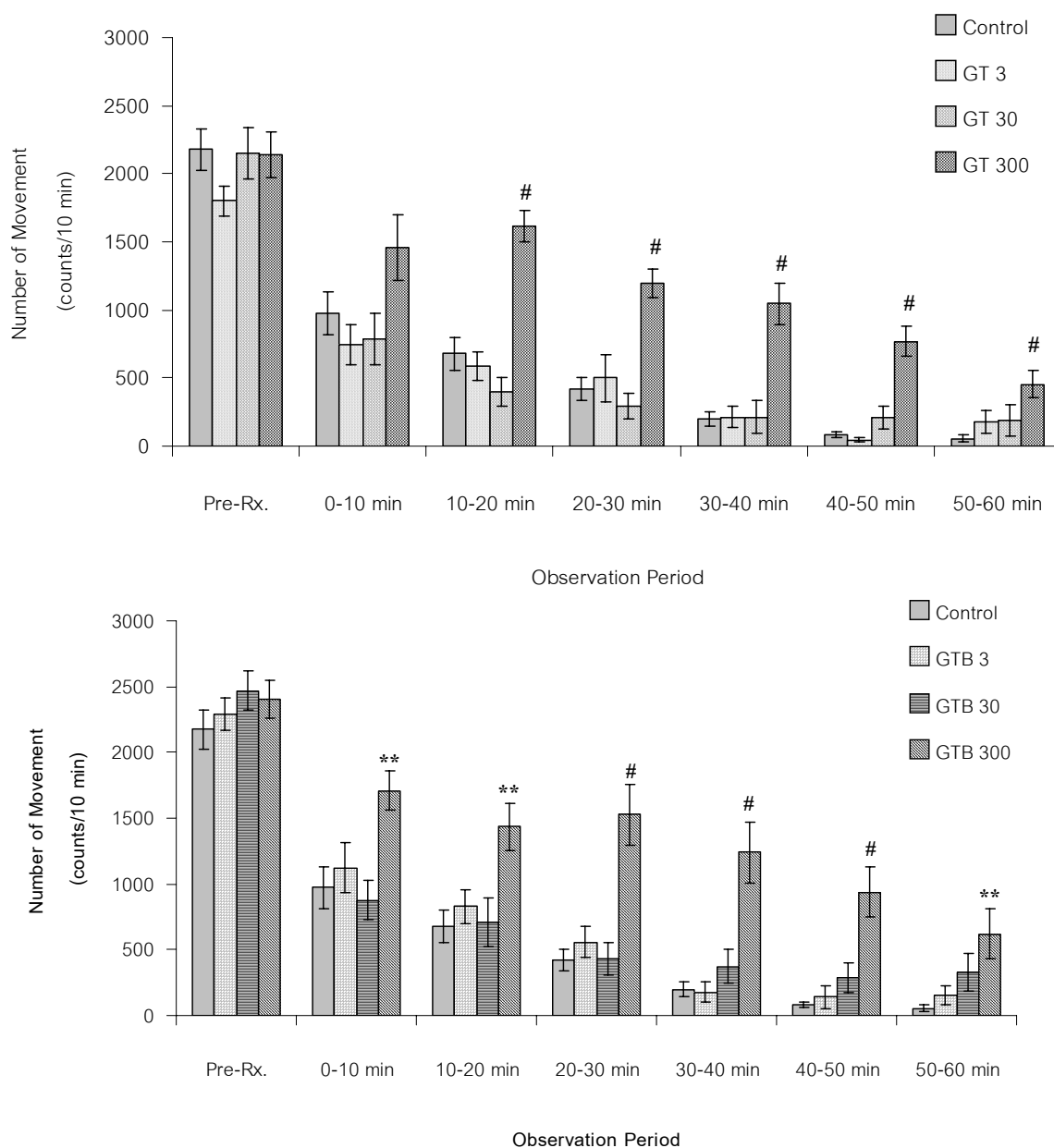
จากผลการทดลองพบว่าในช่วงก่อนป้อนสารสกัด (Pre-Rx) หนูถีบจักรกลุ่มที่ได้รับชาเขียวขนาด 3 (GT 3, n=8), 30 (GT 30, n=8), 300 (GT 300, n=8), และกากชาเขียวขนาด 3 (กลุ่ม GTB 3, n=10), 30 (กลุ่ม GTB 30, n=10), และ 300 (กลุ่ม GTB 300, n=10) มก./กก. น้ำหนักตัว มีค่าเฉลี่ยจำนวนครั้งการเคลื่อนไหวไม่แตกต่างกับหนูถีบจักรกลุ่มที่ได้รับน้ำกลั่น (กลุ่ม Control, n=10) ที่มีค่าเฉลี่ยจำนวนครั้งการเคลื่อนไหวเท่ากับ $2,177.50 \pm 148.71$ ครั้ง/10 นาที ($P > 0.05$, ANOVA)

หลังจากป้อนน้ำหรือสารสกัดในช่วง 0-10 นาที หนูทดลองกลุ่ม GT 300 มีค่าเฉลี่ยจำนวนครั้งการเคลื่อนไหวเท่ากับ $1,455.63 \pm 239.26$ ครั้ง/10 นาที ซึ่งมากกว่าหนูทดลองกลุ่ม Control ที่มีค่าเฉลี่ยจำนวนครั้งการเคลื่อนไหวเท่ากับ 974.00 ± 157.76 แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$, ANOVA) แต่ช่วง 10-20 ช่วง 20-30 ช่วง 30-40 ช่วง 40-50 และช่วง 50-60 นาที หนูทดลองกลุ่ม GT 300 มีค่าเฉลี่ยจำนวนครั้งการเคลื่อนไหวมากกว่าหนูทดลองกลุ่ม Control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) ส่วนหนูกลุ่ม GT 30 และกลุ่ม GT 3 มีค่าเฉลี่ยจำนวนครั้งการเคลื่อนไหว ไม่แตกต่างกับหนูทดลองกลุ่ม Control (รูปที่ 14 และตาราง 3)

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยจำนวนครั้งการเคลื่อนไหวทั้งหมดของหนูในแต่ละกลุ่ม (ครั้ง/10 นาที)

Group	Pre-Rx	0-10 min	10-20 min	20-30 min	30-40 min	40-50 min	50-60 min
Control	2177.50±148.71	974.00±157.76	678.10±124.20	149.30±81.68	198.00±56.01	81.70±22.47	55.90±28.87
GT 3	1802.56±111.41	746.00±144.01	586.56±102.80	500.44±172.91	212.78±81.29	46.44±15.56	175.00±82.21
GT 30	2149.88±191.28	784.25±186.57	401.00±140.71	292.13±92.44	214.50±119.45	209.75±82.34	186.50±116.85
GT 300	2142.63±167.62	1455.63±239.26	1616.63±115.61 [#]	1193.63±106.11 [#]	1045.75±150.90 [#]	770.75±111.92 [#]	453.00±101.19 [#]
GTB 3	2295.10±124.03	1123.20±191.56	827.40±126.47	557.80±117.86	176.90±78.49	138.70±89.64	151.00±69.99
GTB 30	2470.40±152.03	875.80±149.40	708.70±181.50	435.10±121.97	374.00±125.95	289.80±111.81	331.00±143.31
GTB 300	2406.90±144.31	1706.80±148.29 ^{**}	1437.30±179.40 ^{**}	1525.71±236.08 [#]	1240.60±231.19 [#]	936.60±190.94 [#]	620.30±190.32 ^{**}

^{**} = $P < 0.01$ และ [#] = $P < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Control สถิติที่ใช้คือ repeated measures one-way ANOVA ตามด้วย Dunnett's *pos hoc* test



รูปที่ 14 ค่าเฉลี่ยจำนวนครั้งการเคลื่อนไหว (number of movement) ของหนูทดลองที่ได้รับน้ำกลั่น ชาเขียวและกากชาเขียวที่ขนาดต่างๆ ก่อน (Pre-Rx) และหลังได้รับน้ำกลั่น (กลุ่ม Control) และ สารสกัดชาเขียวเพียงครั้งเดียวที่ขนาด 300 (กลุ่ม GT 300) ขนาด 30 (กลุ่ม GT 30) หรือขนาด 3 (กลุ่ม GT 3) มก./กก. น้ำหนักตัว สารสกัดกากชาเขียวเพียงครั้งเดียวที่ขนาด 300 (กลุ่ม GTB 300) ขนาด 30 (กลุ่ม GTB 30) หรือขนาด 3 (กลุ่ม GTB 3) มก./กก. น้ำหนักตัวโดยแสดงเป็นค่าเฉลี่ยจำนวนครั้งของการเคลื่อนไหวต่อ 10 นาที เป็นเวลาทั้งหมด 60 นาที ($P < 0.01$ $^{\#}P < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบ กับกลุ่ม Control, ANOVA ตามด้วย Dunnett's *pos hoc* test)

1.2 ผลต่อความเร็วในการเคลื่อนไหว

จากผลการทดลองพบว่าในช่วงก่อนป้อนน้ำหรือสารสกัด (Pre-Rx) หนูทดลองกลุ่ม GT 30 กลุ่ม GT 300 กลุ่ม GTB 3 กลุ่ม GTB 30 และ กลุ่ม GTB 300 มีค่าเฉลี่ยความเร็วในการเคลื่อนไหวไม่แตกต่างกับหนูทดลองกลุ่ม Control ส่วนหนูทดลองกลุ่ม GT 3 มีค่าเฉลี่ยความเร็วในการเคลื่อนไหว น้อยกว่ากลุ่ม Control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

หลังจากป้อนน้ำหรือสารสกัด หนูทดลองกลุ่ม GT 300 มีค่าเฉลี่ยความเร็วในการเคลื่อนไหว ในช่วง 0-10 ช่วง 10-20 ช่วง 20-30 และ ช่วง 30-40 นาที มากกว่าหนูทดลองกลุ่ม Control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ไม่มีความแตกต่างในช่วง 40-50 และช่วง 50-60 นาที ($P > 0.05$) ส่วนหนูทดลองกลุ่ม GT 30 มีค่าเฉลี่ยความเร็วในการเคลื่อนไหวไม่แตกต่างกับหนูทดลองกลุ่ม Control ทุกช่วงหลังจากป้อนน้ำหรือสารสกัด ($P > 0.05$) สำหรับหนูทดลองกลุ่ม GT 3 มีค่าเฉลี่ยความเร็วในการเคลื่อนไหวน้อยกว่ากลุ่ม Control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในช่วง 0-10 นาที ($P < 0.05$) แต่ในช่วง 10-20 ช่วง 20-30 ช่วง 30-40 ช่วง 40-50 และช่วง 50-60 นาที ไม่แตกต่างกับกลุ่ม Control ($P > 0.05$) แสดงดังรูปที่ 15 (กราฟบน) และ ตารางที่ 4

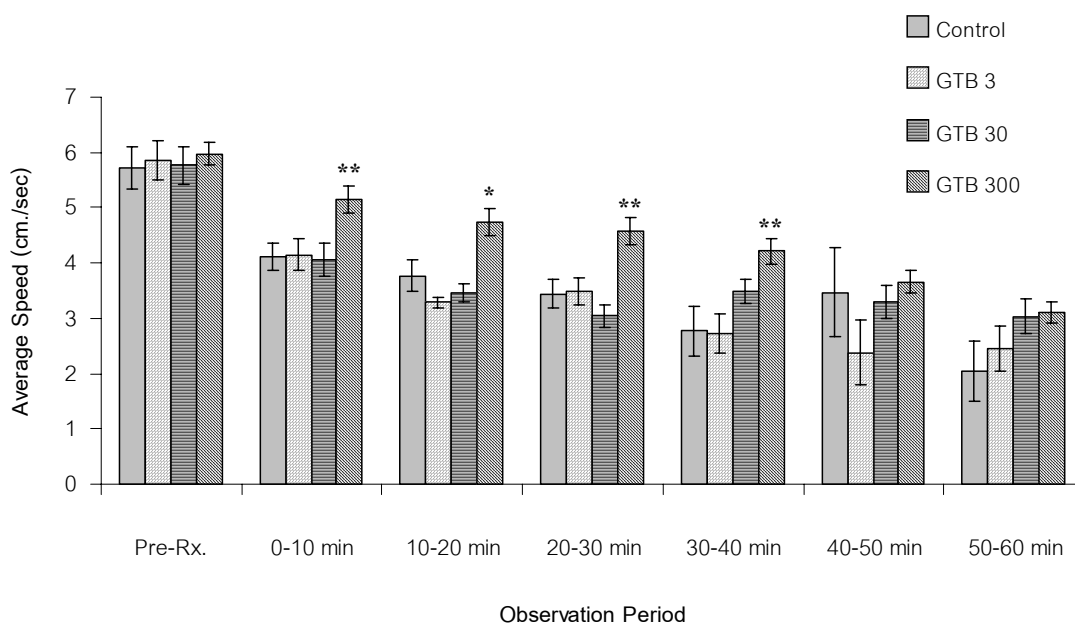
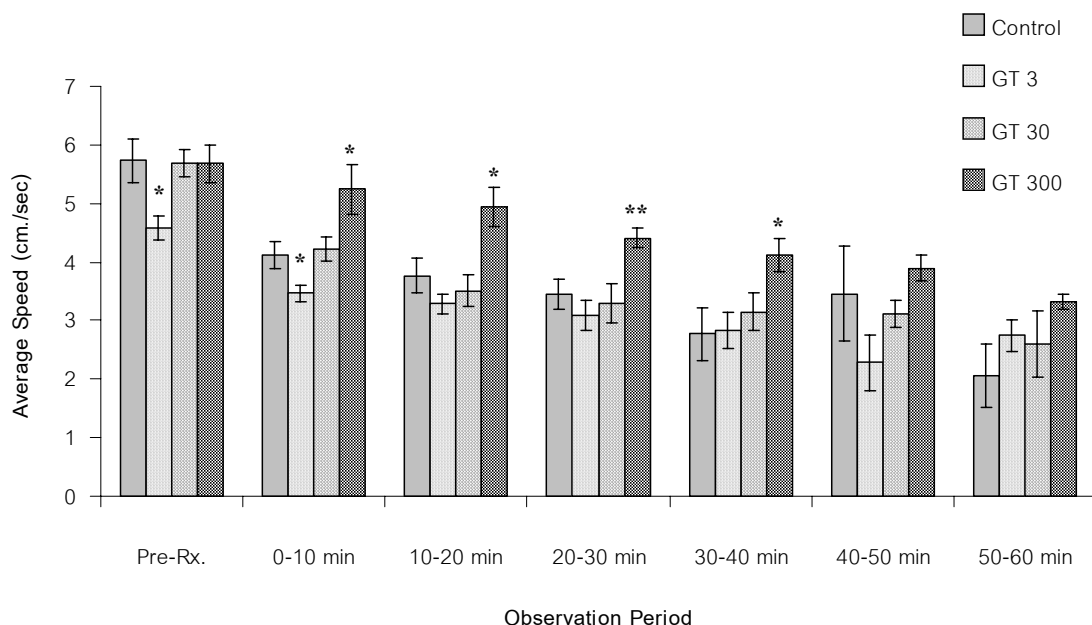
ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ยความเร็วในการเคลื่อนไหวของหนูในแต่ละกลุ่ม (เซนติเมตร/วินาที)

Group	Pre-Rx	0-10 min	10-20 min	20-30 min	30-40 min	40-50 min	50-60 min
Control	5.73±0.38	4.12±0.24	3.77±0.29	3.44±0.25	2.77±0.44	3.46±0.80	2.05±0.54
GT 3	4.58±0.21*	3.47±0.14*	3.29±0.17	3.09±0.26	2.82±0.31	2.28±0.49	2.74±0.28
GT 30	5.69±0.23	4.23±0.21	3.51±0.27	3.29±0.33	3.15±0.33	3.11±0.23	2.60±0.57
GT 300	5.68±0.31	5.24±0.43*	4.94±0.33*	4.41±0.17**	4.11±0.28*	3.89±0.22	3.31±0.12
GTB 3	5.85±0.36	4.15±0.29	3.29±0.10	3.48±0.24	2.72±0.35	2.38±0.58	2.46±0.40
GTB 30	5.77±0.34	4.06±0.29	3.45±0.16	3.04±0.20	3.48±0.22	3.29±0.29	3.03±0.32
GTB 300	5.97±0.21	5.15±0.25**	4.74±0.23*	4.57±0.24**	4.21±0.24**	3.66±0.21	3.10±0.20

* $P < 0.05$ และ ** $P < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Control (ANOVA ตามด้วย Dunnett's *post hoc* test)

สำหรับหนูทดลองกลุ่ม GTB 300 เมื่อได้รับสารสกัดแล้วมีค่าเฉลี่ยความเร็วในการเคลื่อนไหวมากกว่าหนูทดลองกลุ่ม Control ในช่วง 0-10 ช่วง 10-20 ช่วง 20-30 และ ช่วง 30-40 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ไม่มีความแตกต่างในช่วง 40-50 และช่วง 50-60 นาที ($P > 0.05$) กลุ่ม GTB 30 และกลุ่ม GTB 3 มีค่าเฉลี่ยความเร็วในการเคลื่อนไหวไม่แตกต่างกับหนู

ทดลองกลุ่ม Control ($P > 0.05$) ทุกช่วงหลังจากป้อนกากชาเขียว แสดงดังรูปที่ 15 (กราฟล่าง) และ ตารางที่ 4 แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากชาเขียวและกากชาที่ความเข้มข้นสูงมีฤทธิ์กระตุ้นระบบประสาทส่วนกลาง ทำให้เกิดพฤติกรรมเคลื่อนไหวเพิ่มมากขึ้น



รูปที่ 15 ค่าเฉลี่ยความเร็วในการเคลื่อนไหว (average speed) ของหนูทดลองที่ได้รับน้ำกลั่นและสารสกัดชาเขียว กากชาเขียว ที่ขนาดต่างๆก่อน (Pre-Rx) และหลังได้รับน้ำกลั่น (กลุ่ม Control) และสารสกัดชาเขียวเพียงครั้งเดียวที่ขนาด 300 (กลุ่ม GT 300) ขนาด 30 (กลุ่ม GT 30) หรือขนาด 3 (กลุ่ม GT 3) มก./กก. น้ำหนักตัว สารสกัดกากชาเขียวเพียงครั้งเดียวที่ขนาด 300 (กลุ่ม GTB 300) ขนาด 30 (กลุ่ม GTB 30) หรือขนาด 3 (กลุ่ม GTB 3) มก./กก. น้ำหนักตัว โดยแสดงเป็น

ค่าเฉลี่ยความเร็วในการเคลื่อนไหวต่อ 10 นาที เป็นเวลาทั้งหมด 60 นาที ($^* = P < 0.05$ และ $^{**} = P < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Control, ANOVA ตามด้วย Dunnett's *pos hoc* test)

2. ผลของการให้ชาเขียวและกากชาเขียวต่อการเพิ่มการเรียนรู้และความจำในหนูหนุ่มที่ฉีด AB_{25-35} ในโพรงสมอง

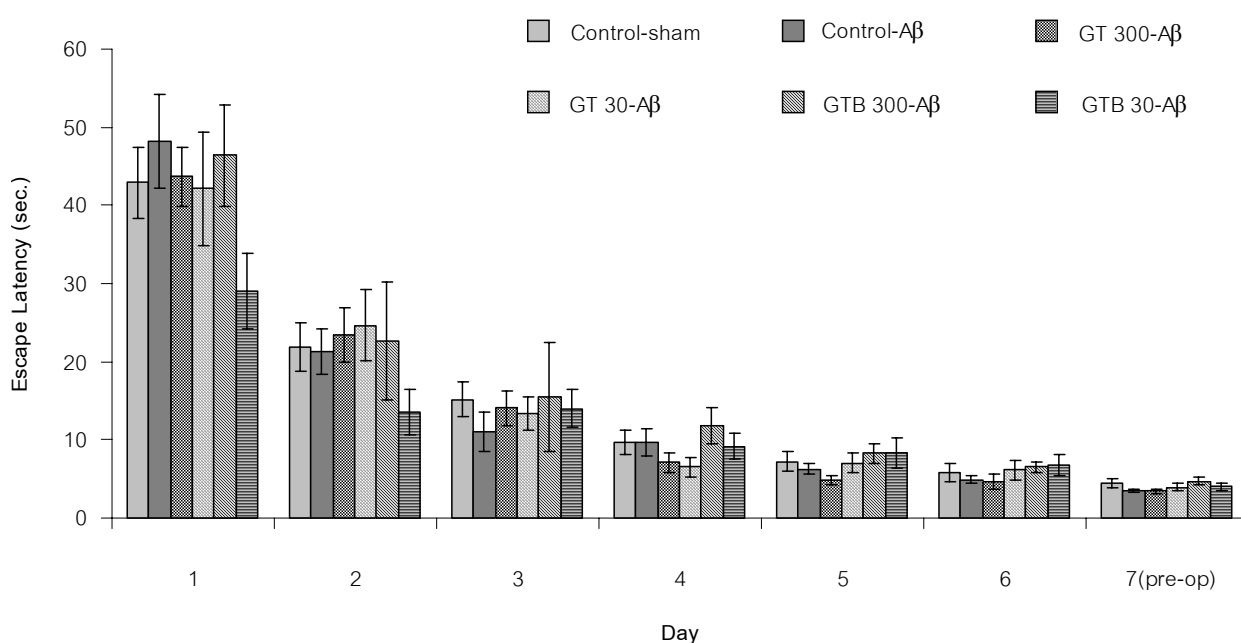
2.1 ทดสอบโดยใช้วิธี Morris's water maze (MWM)

ก่อนผ่าตัดหนูทดลองทุกกลุ่มจะถูกฝึกพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำโดยใช้วิธี MWM เป็นเวลา 7 วัน จากผลการทดลองพบว่า หนูทดลองทุกกลุ่มมีค่าเฉลี่ยระยะเวลาในการค้นหาแท่นได้น้ำ (escape latency) ลดลงจากวันแรกจนถึงวันสุดท้ายของการฝึกและไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$, one-way ANOVA) แสดงดังภาพที่ 16

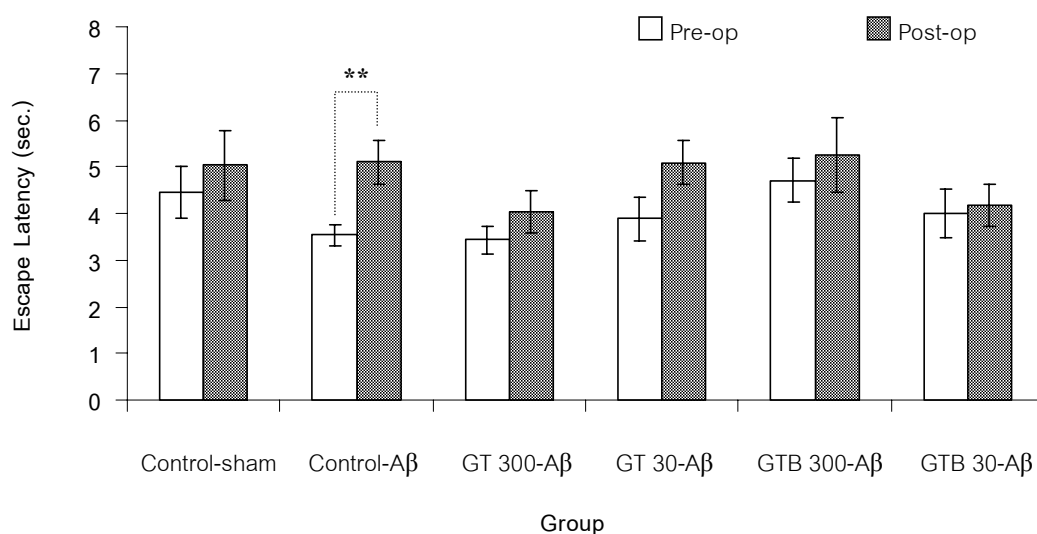
ในวันที่ 20 หลังจากผ่าตัดหนูทดลองทุกกลุ่มจะถูกทดสอบโดยใช้วิธี MWM อีกครั้ง จากผลการทดลองพบว่า หนูทดลองทุกกลุ่มมีค่าเฉลี่ย escape latency ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$, one-way ANOVA) แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย escape latency ภายในกลุ่มระหว่างก่อนและหลังผ่าตัดพบว่า หนูทดลองกลุ่มที่ได้รับน้ำกลั่นและถูกฉีด AB_{25-35} เข้าไปยังบริเวณโพรงสมองเพื่อชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่อง (กลุ่ม Control- AB) ($n=13$) มีค่าเฉลี่ย escape latency หลังผ่าตัดมากกว่าก่อนผ่าตัดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$, Student's pair t-test) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 5.10 ± 0.48 และ 3.54 ± 0.23 วินาที ตามลำดับ ส่วนหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับน้ำกลั่นและไม่ถูกชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่อง โดยถูกฉีดด้วยน้ำเกลือเข้าไปยังบริเวณโพรงสมอง (กลุ่ม Control-sham) ($n=19$) และหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับชาเขียวขนาด 30 (กลุ่ม GT 30- AB) ($n=11$) และ 300 (กลุ่ม GT 300- AB) ($n=10$) และกากชาเขียวขนาด 30 (กลุ่ม GTB 30- AB) ($n=9$) และ 300 (กลุ่ม GTB 300- AB) ($n=12$) มก. /กก. น้ำหนักตัว และถูกฉีด AB_{25-35} เข้าไปยังบริเวณโพรงสมองเพื่อชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่อง พบว่ามีค่าเฉลี่ย escape latency หลังผ่าตัดมากกว่าก่อนผ่าตัดแต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$, Student's pair t-test) โดยพบว่ามีค่าเฉลี่ย escape latency หลังผ่าตัดของหนูทดลองกลุ่ม Control-sham กลุ่ม GT 30- AB กลุ่ม GT 300- AB กลุ่ม GTB 30- AB และกลุ่ม GTB 300- AB มีค่าเท่ากับ 5.04 ± 0.74 วินาที 4.03 ± 0.45 วินาที 5.09 ± 0.47 วินาที 5.25 ± 0.80 วินาที และ 4.19 ± 0.45 วินาที ตามลำดับ และค่าเฉลี่ย escape latency ก่อนผ่าตัดมีค่าเท่ากับ 4.44 ± 0.55 วินาที 3.43 ± 0.29 วินาที 3.88 ± 0.49 วินาที 4.17 ± 0.48 วินาที และ 4.00 ± 0.52 วินาที ตามลำดับ แสดงดัง

ภาพที่ 17 ค่าเฉลี่ยระยะเวลาในการค้นหาแท่นได้น้ำ หรือค่า escape latency ของหนูทดลองทุกกลุ่มในช่วงฝึกก่อนผ่าตัดและในวันทดสอบหลังผ่าตัด

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าหนูทดลองกลุ่ม Control- A β เกิดการบกพร่องของความจำเกี่ยวกับสถานที่ (spatial memory) เนื่องจากไม่สามารถจดจำตำแหน่งของแท่นได้น้ำได้ จึงใช้ระยะเวลาในการค้นหาแท่นได้น้ำนานกว่าก่อนผ่าตัด ส่วนหนูทดลองที่ได้รับชาเขียวและกาชาเขียวขนาด 30 และ 300 มก./กก. น้ำหนักตัว และถูกผ่าตัดเพื่อฉีด A β ₂₅₋₃₅ เข้าไปยังบริเวณโพรงสมอง ไม่พบว่าเกิดภาวะความจำบกพร่องเนื่องจากมีระยะเวลาในการค้นหาแท่นได้น้ำหลังผ่าตัดใกล้เคียงกับก่อนผ่าตัด



รูปที่ 16 ค่าเฉลี่ยระยะเวลาในการค้นหาแท่นได้น้ำ (escape latency) ในช่วงฝึกเป็นเวลาทั้งหมด 7 วัน ก่อนผ่าตัดเพื่อชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่องของหนูทดลองแต่ละกลุ่ม ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่ม ($P > 0.05$, ANOVA)

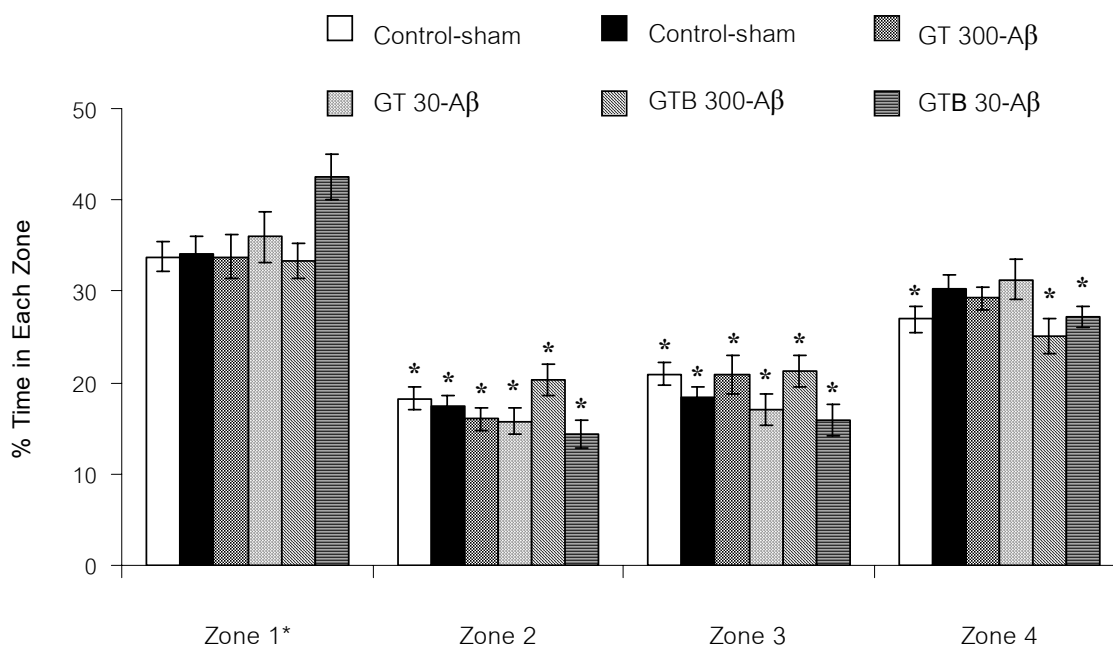


รูปที่ 17 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระยะเวลาในการค้นหาแท่นได้น้ำ (escape latency) ของหนูทดลองแต่ละกลุ่มก่อน (pre-op) และวันที่ 20 จากหลังผ่าตัด (post-op) ชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่อง (** $P < 0.01$, Student's pair t-test)

จากผลการทดสอบ probe trial (รูปที่ 18) หนูทดลองทุกกลุ่มมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ของระยะเวลาในการว่ายน้ำอยู่ใน zone 1 (เป็น zone ที่เคยมีแท่นได้น้ำ) มากกว่า zone อื่นๆ ซึ่งไม่แตกต่างกันมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่ม ($P > 0.05$, ANOVA) แต่เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ของระยะเวลาในการว่ายน้ำใน zone 1 กับ zone อื่นๆ พบว่า หนูทดลองกลุ่ม Control-Aβ กลุ่ม GT 30-Aβ และกลุ่ม GT 300-Aβ มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ของระยะเวลาในการว่ายน้ำใน zone 1 มากกว่า zone 2 และ zone 3 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$, Student's pair t-test) แต่ไม่แตกต่างกับ zone 4 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$, Student's pair t-test) โดยค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ของระยะเวลาในการว่ายน้ำใน zone 1 zone 2 zone 3 และ zone 4 ของหนูทดลองกลุ่ม Control-Aβ มีค่าเท่ากับ 34.05 ± 2.05 %, 17.40 ± 1.22 %, 18.30 ± 1.29 % และ 30.25 ± 1.51 % ตามลำดับ หนูทดลองกลุ่ม GT 30-Aβ มีค่าเท่ากับ 35.93 ± 2.70 %, 15.77 ± 1.48 %, 17.06 ± 1.76 % และ 31.25 ± 2.19 % ตามลำดับ และ หนูทดลองกลุ่ม GT 300-Aβ มีค่าเท่ากับ 33.80 ± 2.39 %, 16.01 ± 1.27 %, 20.90 ± 2.12 % และ 29.28 ± 1.22 % ตามลำดับ ในขณะที่หนูทดลองกลุ่ม Control-sham กลุ่ม GTB 30-Aβ และกลุ่ม GTB 300-Aβ มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ของระยะเวลาในการว่ายน้ำใน zone 1 มากกว่า zone 2 zone 3 และ zone 4 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$, Student's pair t-test) แสดงดังภาพที่ 17 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ของระยะเวลาในการว่ายน้ำใน zone 1 zone 2 zone 3 และ zone 4 ของหนูทดลองกลุ่ม Control-sham มีค่าเท่ากับ 33.81 ± 1.54 %, 18.26 ± 1.19 %

20.93 $\pm$ 1.20%, และ 26.99 $\pm$ 1.42% ตามลำดับ หนูทดลองกลุ่ม GTB 30-A β มีค่าเท่ากับ 42.53 $\pm$ 2.46 %, 14.39 $\pm$ 1.50 %, 15.92 $\pm$ 1.67 % และ 27.16 $\pm$ 1.12 % ตามลำดับ และหนูทดลองกลุ่ม GTB 300A β มีค่าเท่ากับ 33.36 $\pm$ 1.87 %, 20.25 $\pm$ 1.76 %, 21.22 $\pm$ 1.77 % และ 25.16 $\pm$ 1.89 % ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ของระยะเวลาในการว่ายน้ำในแต่ละ zone ของหนูทดลองในแต่ละกลุ่ม

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าหนูทดลองกลุ่ม Control- A β เกิดความบกพร่องของความจำระยะยาวที่เกี่ยวกับสถานที่ (spatial memory) จึงมีความสามารถในการจดจำตำแหน่งของแท่นได้น้ำได้ไม่แม่นยำเท่ากับหนูทดลองกลุ่ม Control-sham หนูทดลองกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากชาเขียวขนาด 30 และ 300 มก. /กก. น้ำหนักตัว และถูกผ่าตัดเพื่อฉีด A β_{25-35} เข้าไปยังบริเวณโพรงสมอง มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ของระยะเวลาในการว่ายน้ำใน zone 1 มากกว่า zone2, zone3 และ zone4 เช่นเดียวกับหนูทดลองกลุ่ม Control-sham ในขณะที่หนูทดลองกลุ่มที่ได้รับชาเขียวขนาด 30 และ 300 มก. /กก. น้ำหนักตัว และถูกผ่าตัดเพื่อฉีด A β_{25-35} เข้าไปยังบริเวณโพรงสมอง มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ของระยะเวลาในการว่ายน้ำใน zone 1* มากกว่า zone 2, zone 3 แต่ไม่แตกต่างกับ zone 4 เช่นเดียวกับหนูทดลองกลุ่ม Control- A β (ตารางที่ 5) แสดงให้เห็นว่ากากชาเขียว อาจสามารถช่วยป้องกันการเกิดภาวะความจำบกพร่องได้ดีกว่าสกัดชาเขียว



รูปที่ 18 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ของระยะเวลาในการว่ายน้ำในแต่ละ zone (% time in each zone) ของหนูทดลองในแต่ละกลุ่ม โดย zone 1* เป็น zone ที่เคยมีแท่นได้น้ำ (* $P < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับ zone ที่เคยมีแท่นได้น้ำ, Student's pair t-test)

ตารางที่ 5 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ของระยะเวลาในการว่ายน้ำในแต่ละ zone ของหนูทดลองในแต่ละกลุ่ม

กลุ่ม	เปอร์เซ็นต์ของระยะเวลาในการว่ายน้ำในแต่ละ zone			
	Zone 1*	Zone 2	Zone 3	Zone 4
Control-sham	33.81	18.26*	20.93*	26.99*
Control-A β	34.05	17.40*	18.30*	30.25
GT 300- A β	33.80	16.01*	20.90*	29.28
GT 30- A β	35.93	15.77*	17.06*	31.25
GTB 300- A β	33.36	20.25*	21.22*	25.16*
GTB 30- A β	42.53	14.39*	15.92*	27.16*

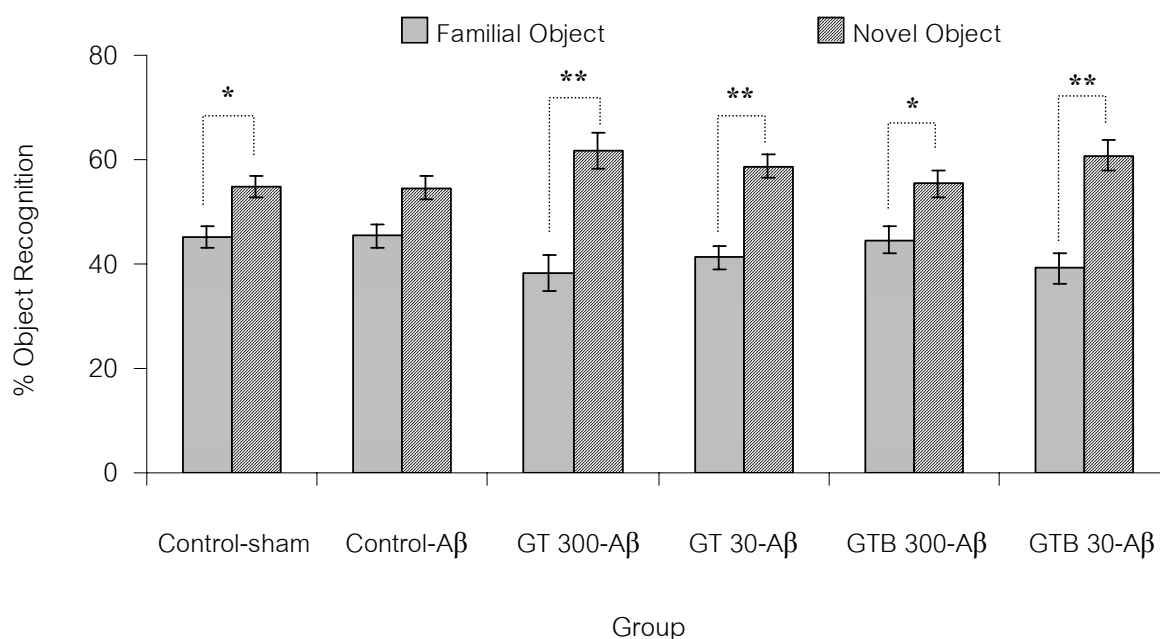
* = $P < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับ zone ที่เคยมีแท่นได้น้ำ, Student's pair t-test

2.2 ทดสอบโดยใช้วิธี Novel object recognition (NOR)

ในวันที่ 24 หลังจากผ่าตัด หนูทุกกลุ่มจะถูกทดสอบโดยใช้วิธี NOR จากผลการทดลองพบว่า หนูทุกกลุ่มมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ระยะเวลาในการสำรวจวัตถุชิ้นใหม่ (% novel object recognition) มากกว่าวัตถุชิ้นเก่า (% familial object recognition) แต่ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่ม ($P > 0.05$, ANOVA) และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ระยะเวลาในการสำรวจวัตถุชิ้นใหม่กับวัตถุชิ้นเก่าพบว่า หนูกลุ่ม Control-A β มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ระยะเวลาในการสำรวจวัตถุชิ้นใหม่เท่ากับ 54.61 ± 2.33 ไม่แตกต่างกับวัตถุชิ้นเก่าที่มีค่าเท่ากับ 45.39 ± 2.33 ($P > 0.05$, Student's pair t-test) ในขณะที่หนูทดลองกลุ่ม Control-sham กลุ่ม GT 30-A β กลุ่ม GT 300-A β กลุ่ม GTB 30-A β และกลุ่ม GTB 300- A β มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ระยะเวลาในการสำรวจวัตถุชิ้นใหม่มากกว่าวัตถุชิ้นเก่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$, Student's pair t-test) แสดงดังภาพที่ 19 โดยหนูทดลองกลุ่ม Control-sham กลุ่ม GT 30- A β กลุ่ม GT 300- A β กลุ่ม GTB 30- A β และกลุ่ม GTB 300- A β มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ระยะเวลาในการสำรวจวัตถุชิ้นใหม่เท่ากับ 54.90 ± 1.99 เท่ากับ 61.81 ± 3.54 เท่ากับ 60.27 ± 2.40 เท่ากับ

55.47±2.60 และเท่ากับ 60.81±2.98 ตามลำดับ และมีเปอร์เซ็นต์ระยะเวลาในการสำรวจวัตถุขึ้น
เท่ากับ 45.10±1.99 เท่ากับ 38.20±3.54 เท่ากับ 39.73±2.40 เท่ากับ 44.53±2.60 และเท่ากับ
39.19±2.98 ตามลำดับ

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าหนูทดลองกลุ่ม Control- A β เกิดความบกพร่องของ
ความจำระยะสั้นในการจดจำวัตถุซึ่งเป็นความจำที่ไม่เกี่ยวกับสถานที่ (non-spatial memory) จึง
จดจำวัตถุที่เคยสำรวจมาแล้วได้ไม่แม่นยำเท่าหนูทดลองกลุ่ม Control-sham ส่วนหนูทดลองกลุ่ม
ที่ได้รับชาเขียวและกากชาเขียวขนาด 30 และ 300 มก. /กก. น้ำหนักตัว และถูกผ่าตัดเพื่อฉีด A β_{25-35}
peptides เข้าไปยังบริเวณโพรงสมองมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ระยะเวลาในการสำรวจวัตถุขึ้นใหม่
มากกว่าวัตถุขึ้นเก่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 6) แสดงให้เห็นว่าชาเขียวและกากชาเขียว
ขนาด 30 และ 300 มก. /กก. น้ำหนักตัว สามารถป้องกันการเกิดภาวะความจำบกพร่องที่เกิดจาก
การชักนำของ A β_{25-35} peptides ได้



รูปที่ 19 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ระยะเวลาในการสำรวจวัตถุ (% object recognition) ขึ้นใหม่
(novel object) กับวัตถุขึ้นเก่า (familial object) ของหนูทดลองในแต่ละกลุ่ม (* $P < 0.05$ และ ** $P < 0.01$
เมื่อเปรียบเทียบระหว่างวัตถุขึ้นเก่ากับวัตถุขึ้นใหม่ , Student's pair t-test)

ตารางที่ 6 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ระยะเวลาในการสำรวจวัตถุชิ้นใหม่และวัตถุชิ้นเก่าของหนูทดลองในแต่ละกลุ่ม

กลุ่ม	เปอร์เซ็นต์ระยะเวลาในการสำรวจวัตถุ	
	วัตถุชิ้นเก่า	วัตถุชิ้นใหม่
Control-sham	45.10	54.90*
Control-A β	45.39	54.61
GT 30- A β	41.31	58.69**
GT 300- A β	38.20	61.80**
GTB 30- A β	39.19	60.81**
GTB 300- A β	44.53	55.47*

* = $P < 0.05$ และ ** = $P < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างวัตถุชิ้นเก่ากับวัตถุชิ้นใหม่, Student's paired t-test

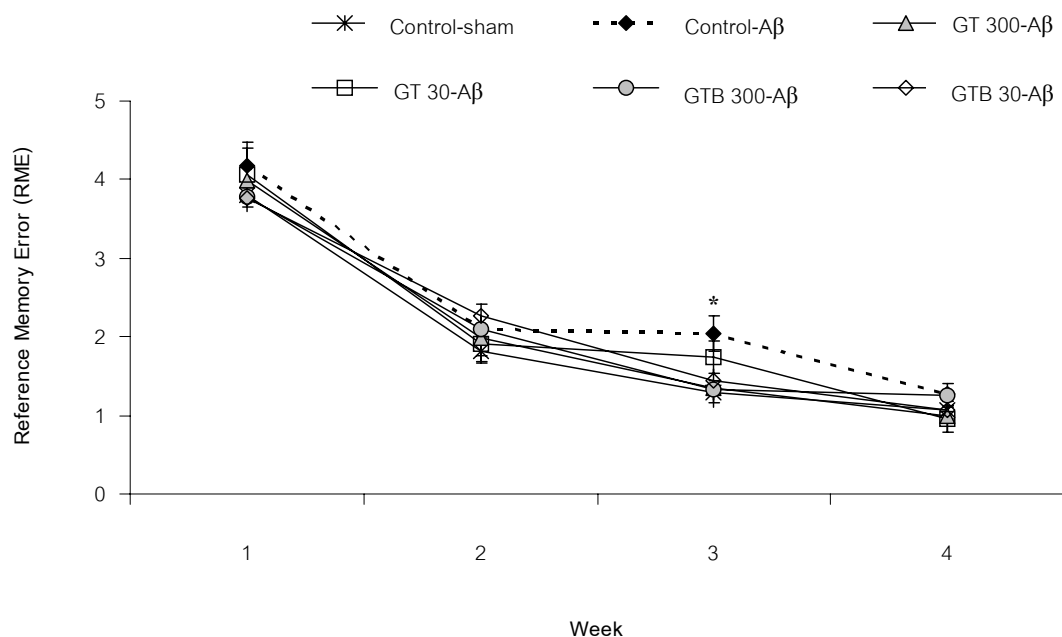
2.3 ทดสอบโดยใช้วิธี Radial arm maze (RAM)

หลังจากชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่องในช่วง 4 สัปดาห์สุดท้าย คือช่วงระหว่างสัปดาห์ที่ 16 ถึง 19 ของการวิจัย หนูทดลองทุกกลุ่มจะถูกทดสอบพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำโดยใช้วิธี RAM และผู้ทดสอบจะทำการบันทึกค่าความผิดพลาดในการจดจำ 2 ชนิดคือ ความผิดพลาดในการจดจำอ้างอิง (reference memory error หรือ RME) และความผิดพลาดของความจำขณะทำงาน (working memory error หรือ WME) จากผลการทดลองพบว่าค่าเฉลี่ย RME ของหนูทุกกลุ่มมีค่าลดลงจากสัปดาห์ที่ 1 จนถึง สัปดาห์ที่ 4 ของการทดสอบ และมีค่าใกล้เคียงกัน ยกเว้นในสัปดาห์ที่ 3 ของการทดสอบ หนูทดลองกลุ่ม Control-A β มีค่าเฉลี่ย RME เท่ากับ 2.04 ± 0.23 ครั้ง มากกว่าหนูกลุ่ม Control-Sham ที่มีค่าเฉลี่ย RME เท่ากับ 1.29 ± 0.14 ครั้ง ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$, ANOVA ตามด้วย Dunnett's pos hoc test) ส่วนหนูกลุ่ม GT 30-A β กลุ่ม GT 300-A β กลุ่ม GTB 30-A β และกลุ่ม GTB 300-A β มีค่าเฉลี่ย RME เท่ากับ 1.35 ± 0.24 ครั้ง 1.74 ± 0.21 ครั้ง 1.33 ± 0.25 ครั้ง และ 1.44 ± 0.16 ครั้ง ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกับหนูทดลองกลุ่ม Control-Sham ($P > 0.05$, ANOVA ตามด้วย Dunnett's pos hoc test) แสดงดังภาพที่ 20 สำหรับ WME ของหนูทุกกลุ่มมีค่าลดลงจาก

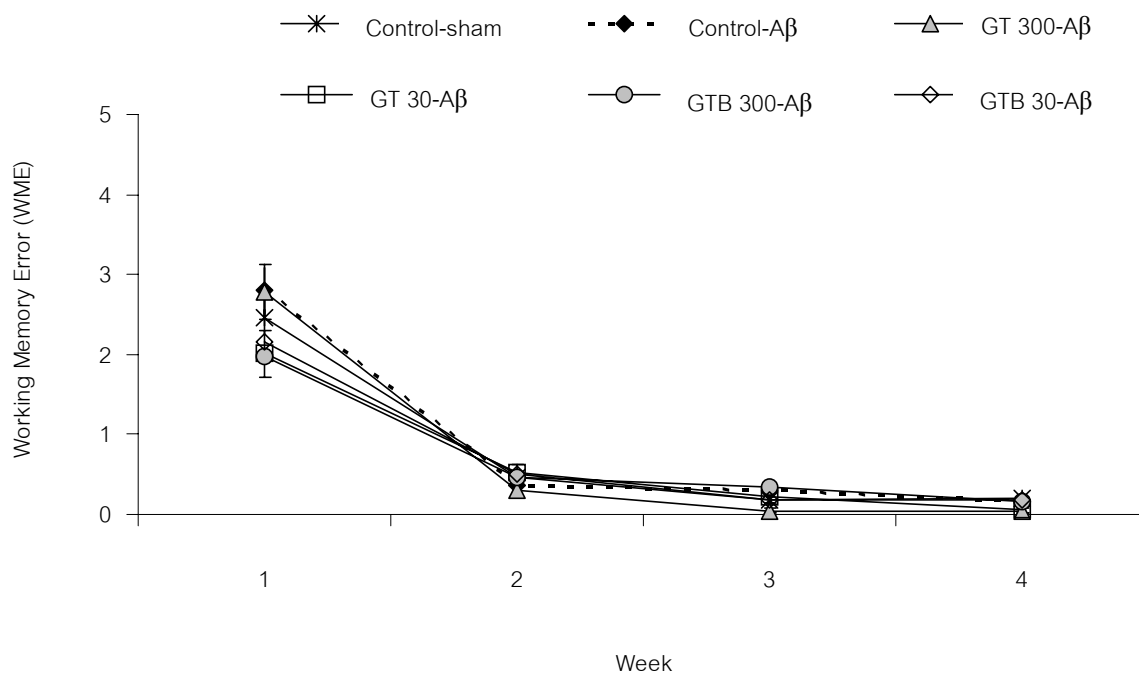
สัปดาห์ที่ 1 จนถึง สัปดาห์ที่ 4 ของการทดสอบและไม่มีความแตกต่างกันระหว่างหนูทดลองแต่ละกลุ่ม ($P > 0.05$, ANOVA) แสดงดังภาพที่ 21

จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าหนูทดลองทุกกลุ่มมีความสามารถในการเรียนรู้และจดจำตำแหน่งอ้างอิง (reference memory) ของอาหารในอุปกรณ์ RAM ได้ดีขึ้นและใกล้เคียงกันจากสัปดาห์ที่ 1 จนถึง สัปดาห์ที่ 4 ของการทดสอบ ยกเว้นในสัปดาห์ที่ 3 ของการทดสอบ หนูทดลองกลุ่ม Control-A β มีความสามารถในการจดจำอ้างอิง (reference memory) ได้น้อยกว่าหนูทดลองกลุ่ม Control-Sham โดยจะเห็นได้จากหนูทดลองกลุ่ม Control-A β มีค่าความผิดพลาดในการจดจำอ้างอิง หรือ RME มากกว่าหนูทดลองกลุ่ม Control-Sham อย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่าหนูทดลองกลุ่ม Control-A β เกิดความบกพร่องของความจำระยะสั้นที่เกี่ยวกับสถานที่ เนื่องจากมีความสามารถในการเรียนรู้และจดจำตำแหน่งของอาหารในอุปกรณ์ RAM ได้ไม่แม่นยำเท่ากับหนูทดลองกลุ่ม Control-Sham ส่วนในสัปดาห์ที่ 1 สัปดาห์ที่ 2 และสัปดาห์ที่ 4 ของการทดสอบ พบว่าหนูทดลองกลุ่ม Control-A β มีความสามารถในการจดจำอ้างอิงไม่ต่างจากหนูทดลองกลุ่ม Control-Sham ส่วนหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับชาเขียวและกากชาเขียวขนาด 30 และ 300 มก. /กก. และถูกผ่าตัดเพื่อฉีด A β_{25-35} peptides เข้าไปยังบริเวณโพรงสมองมีค่า RME ไม่ต่างจากหนูทดลองกลุ่ม Control-Sham แสดงให้เห็นว่าสารสกัดชาเขียวและกากชาเขียวขนาด 30 และ 300 มก. /กก. น้ำหนักตัว สามารถป้องกันการเกิดภาวะความจำบกพร่องที่เกิดจากการชักนำของ A β_{25-35} peptides ได้ สำหรับความสามารถของความจำขณะทำงาน (working memory) พบว่าหนูทดลองทุกกลุ่มมีความสามารถของความจำขณะทำงานใกล้เคียงกัน โดยจะเห็นได้จากหนูทดลองกลุ่ม Control-A β มีค่าเฉลี่ยความผิดพลาดของความจำขณะทำงาน หรือ WME จากสัปดาห์ที่ 1 จนถึง สัปดาห์ที่ 4 ไม่แตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่า A β_{25-35} peptides อาจไม่มีผลกระทบกระตุ้นให้เกิด A β เกิดความบกพร่องของความจำขณะทำงานที่เกี่ยวกับสถานที่

จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าการฉีด A β_{25-35} peptides ส่งผลให้เกิดความจำบกพร่องของความจำระยะยาวและความจำระยะสั้นที่เกี่ยวกับสถานที่ เมื่อทดสอบด้วยวิธี MWM และ RAM และความจำในการจดจำวัตถุสิ่งของซึ่งเป็นความจำที่ไม่เกี่ยวกับสถานที่ เมื่อทดสอบด้วยวิธี NOR แต่อาจไม่มีผลกระทบกระตุ้นให้เกิดความจำบกพร่องของความจำขณะทำงาน และชาเขียวและกากชาเขียวขนาด 30 และ 300 มก. /กก. น้ำหนักตัว มีฤทธิ์ในการป้องกันการเกิดภาวะความจำบกพร่องที่เกิดจากการชักนำของ A β_{25-35} peptides ได้



รูปที่ 20 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย reference memory error (RME) ของหนูทดลองแต่ละกลุ่ม เมื่อทดสอบการเรียนรู้และความจำด้วยวิธี radial arm maze (RAM) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (* = $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Control-sham, one-way repeated measures ANOVA ตามด้วย Dunnett's pos hoc test)



รูปที่ 21 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย working memory error (WME) ของหนูทดลองแต่ละกลุ่ม เมื่อทดสอบการเรียนรู้และความจำด้วยวิธี radial arm maze (RAM) เป็นเวลา 4 สัปดาห์

3. ผลการทดสอบซาเขียวและกากซาเขียวต่อการเพิ่มการเรียนรู้และความจำในหนูหนูที่ถูกฉีด AB_{25-35} peptides ที่สมองส่วน enthorinal cortex

3.1 ผลการทดสอบความจำด้วย RAM ในหนูหนูก่อนการผ่าตัด

ผลการทดลองในหนูหนูในช่วงก่อนการผ่าตัดชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่อง พบว่า หนูหนูกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ถูกชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่อง (Control sham), หนูทดลองกลุ่มควบคุมที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่อง (Control AB), กลุ่มที่ได้รับสารสกัดซาเขียวที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่อง (GT AB) และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดกากซาเขียวที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่อง (GTB AB) มีจำนวนรวมของการผิดพลาด (TME) ในการเข้าไปหาอาหารใน RAM เป็น ดังตาราง 7 ซึ่งค่าที่ได้ในแต่ละกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$, ANOVA)

ตารางที่ 7 ค่าจำนวนรวมของการผิดพลาด TME ในการเข้าไปหาอาหารใน RAM และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยของหนูหนูแต่ละกลุ่ม

Wk No.	Control Sham (counts)	Control AB (counts)	GT + AB (counts)	GTB + AB (counts)
1	5.9 ± 0.6	6.4 ± 0.7	6.0 ± 0.5	6.9 ± 0.6
2	2.9 ± 0.2	2.9 ± 0.3	2.5 ± 0.2	2.7 ± 0.4
3	1.6 ± 0.2	2.1 ± 0.3	1.8 ± 0.2	1.7 ± 0.3
4	1.1 ± 0.1	1.3 ± 0.2	1.3 ± 0.2	1.5 ± 0.1
5	1.1 ± 0.2	1.1 ± 0.2	1.0 ± 0.2	1.2 ± 0.2

ส่วนผลการทดลองของความผิดพลาดของการทำงานของความจำอ้างอิง (RME) ในหนูทดลองโตเต็มวัยหรือหนูหนูพบว่า หนูหนูกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ถูกชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่อง, หนูหนูกลุ่มควบคุมที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่อง, หนูหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดซาเขียวที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่อง และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดกากซาเขียวที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่อง มีจำนวนของการผิดพลาด RME ในการเข้าไปหาอาหารใน RAM เป็นดังตาราง 8 ซึ่งในแต่ละกลุ่มไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$, ANOVA)

ตารางที่ 8 ค่าจำนวนรวมของการผิดพลาด RME ในการเข้าไปหาอาหารใน RAM และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยของหนูหนุ่มแต่ละกลุ่ม

Wk No.	Control Sham (counts)	Control AB (counts)	GT + AB (counts)	GTB + AB (counts)
1	3.4 ± 0.3	4.2 ± 0.4	3.6 ± 0.4	4.0 ± 0.4
2	2.3 ± 0.2	2.4 ± 0.2	1.9 ± 0.2	2.1 ± 0.2
3	1.4 ± 0.1	1.8 ± 0.2	1.5 ± 0.2	1.5 ± 0.3
4	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.2	1.1 ± 0.2	1.2 ± 0.1
5	1.1 ± 0.2	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.2	1.1 ± 0.2

นอกจากนั้นผลการทดลองของความผิดพลาดของการทำงานของความจำขณะทำงาน (WME) ในหนูทดลองโตเต็มวัยหรือหนูหนุ่มพบว่า หนูหนุ่มกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ถูกชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่อง, หนูหนุ่มกลุ่มควบคุมที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่อง, กลุ่มที่ได้รับสารสกัดชาเขียวที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่อง และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดกากชาเขียวที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่อง มีจำนวนของการผิดพลาด WME ในการเข้าไปหาอาหารใน RAM เป็นดังตาราง 9 ซึ่งในค่าที่ได้แต่ละกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$, ANOVA)

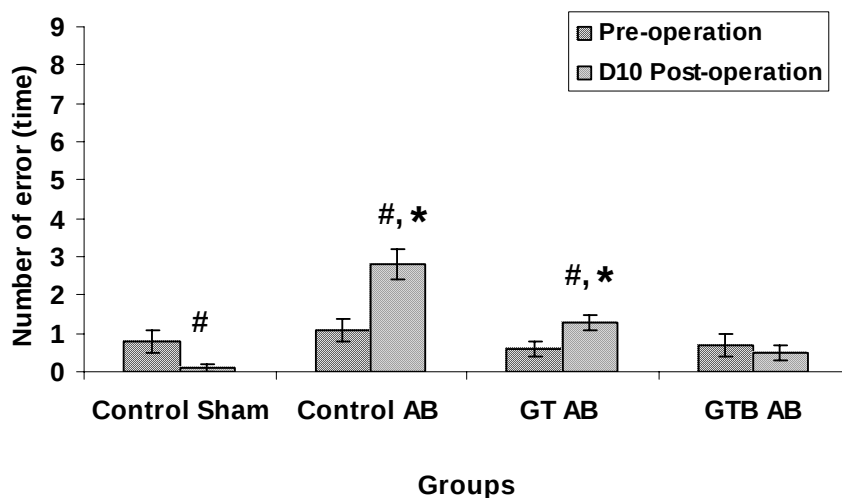
ตารางที่ 9 ค่าจำนวนของการผิดพลาด WME ในการเข้าไปหาอาหารใน RAM และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยของหนูหนุ่มแต่ละกลุ่ม

Wk No.	Control Sham (counts)	Control AB (counts)	GT + AB (counts)	GTB + AB (counts)
1	2.5 ± 0.4	2.3 ± 0.3	2.3 ± 0.4	2.9 ± 0.3
2	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.2
3	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.1
4	0.0 ± 0.02	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1
5	0.1 ± 0.05	0.1 ± 0.03	0.1 ± 0.03	0.1 ± 0.05

3.2 ผลการทดสอบความจำด้วย RAM ในหนูหนุ่มภายหลังการผ่าตัดชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่อง

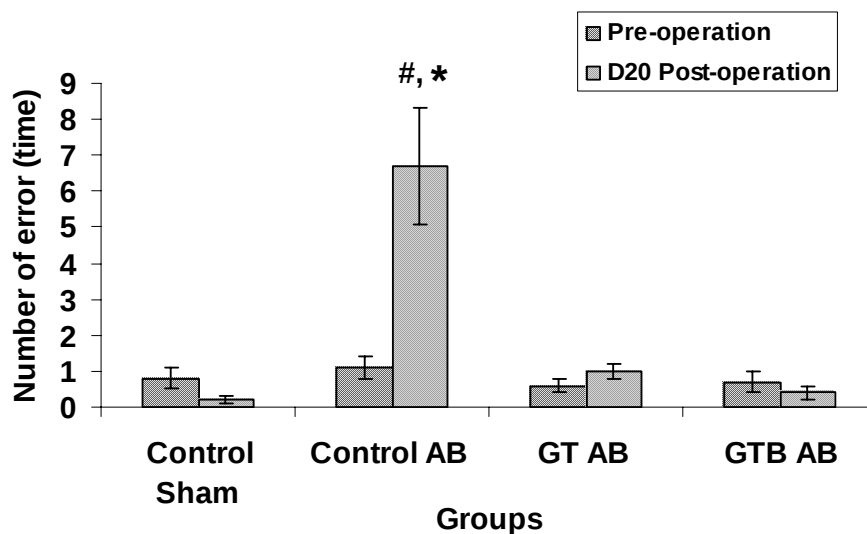
จำนวนครั้งรวมของการผิดพลาด (TME), ความผิดพลาดของการทำงานของความจำอ้างอิง (RME) และความผิดพลาดของการทำงานของความจำขณะทำงาน (WME) ในการเข้าไปหาอาหารใน RAM ของหนูทดลองโตเต็มวัยภายหลังการผ่าตัดชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่อง 10 วัน และ 20 วันของหนูหนุ่มแต่ละกลุ่มถูกนำมาเปรียบเทียบกับ TME, RME และ WME ในวันสุดท้ายของการฝึกก่อนการผ่าตัดชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่อง โดยแสดงค่า TME, RME และ WME ในวันสุดท้ายของการฝึกเปรียบเทียบกับ TME, RME และ WME ของ 10 วัน และ 20 วันภายหลังการผ่าตัดชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่องของหนูหนุ่มในแต่ละกลุ่ม

ค่าเฉลี่ย TME ในวันสุดท้ายของการฝึกก่อนการผ่าตัดเพื่อชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่องของหนูแต่ละกลุ่มคือหนูหนุ่มกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ถูกชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่อง (Control Sham), หนูทดลองกลุ่มควบคุมที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่อง (Control A β), กลุ่มที่ได้รับสารสกัดชาเขียวที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่อง (GT A β) และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดกากชาเขียวที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่อง (GTB A β) มีค่าเฉลี่ยคิดเป็น 0.8 ± 0.3 , 1.1 ± 0.3 , 0.6 ± 0.2 และ 0.7 ± 0.3 ครั้ง ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ภายหลังการผ่าตัดชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่องเป็นเวลา 10 วัน พบว่า ค่าเฉลี่ย TME ของหนูหนุ่มกลุ่ม Control Sham, Control A β , GT A β และ GTB A β เป็น 0.1 ± 0.1 , 2.8 ± 0.4 , 1.3 ± 0.2 และ 0.5 ± 0.2 ครั้ง ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบภายในกลุ่มระหว่างวันสุดท้ายของการฝึกและภายหลังการผ่าตัดชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่องเป็นเวลา 10 วันของหนูหนุ่มแต่ละกลุ่มโดยใช้ Student's paired t-test พบว่าหนูหนุ่มกลุ่ม Control sham มี TME ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติภายหลังการผ่าตัด ในขณะที่หนูหนุ่มกลุ่ม Control A β และกลุ่ม GT A β มี TME เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติภายหลังการผ่าตัดชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่อง ส่วนกลุ่ม GTB A β พบว่าค่าเฉลี่ย TME ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างวันสุดท้ายของการฝึกและภายหลังการผ่าตัดชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่องเป็นเวลา 10 วัน และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย TME ภายหลังการผ่าตัดชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่องเป็นเวลา 10 วัน ระหว่างกลุ่ม พบว่าหนูทดลองกลุ่ม Control AB และ GT AB มีค่าเฉลี่ย TME สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Control sham ดังรูปที่ 22



รูปที่ 22 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย total memory error (TME) ของหนูกลุ่มควบคุมทั้ง control sham และ control AB กับกลุ่มที่ได้รับชาเขียว (GT AB) และกากชา (GTB AB) ในช่วงก่อนการผ่าตัด (Pre-operation) กับวันที่ 10 หลังการผ่าตัด (D10 Post-operation) เพื่อฉีดน้ำเกลือ (sham) หรือ amyloid β peptides (AB) เข้าในสมองส่วน enthorinal cortex (# หมายถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับวันสุดท้ายก่อนการผ่าตัด และ * หมายถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control sham)

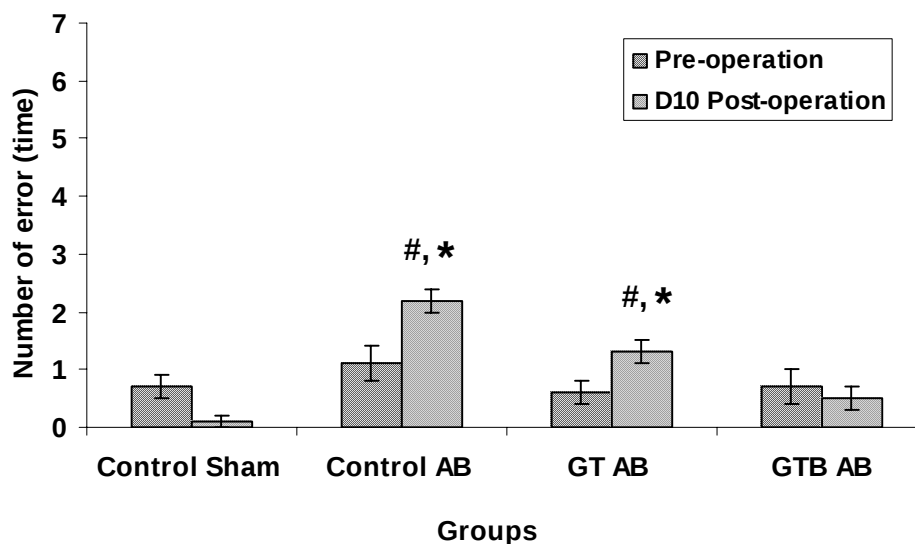
ภายหลังการผ่าตัดชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่องเป็นเวลา 20 วัน พบว่า ค่าเฉลี่ย TME ของหนูกลุ่ม Control sham, Control $A\beta$, GT $A\beta$ และ GTB $A\beta$ เป็น 0.2 ± 0.1 , 6.7 ± 1.6 , 1.0 ± 0.2 และ 0.4 ± 0.2 ครั้ง ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบภายในกลุ่มระหว่างวันสุดท้ายของการฝึกและภายหลังการผ่าตัดชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่องเป็นเวลา 20 วันของหนูกลุ่มแต่ละกลุ่มโดยใช้ Student's paired t-test พบว่าหนูกลุ่ม Control $A\beta$ มีค่าเฉลี่ย TME เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติภายหลังการผ่าตัดชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่อง ส่วนกลุ่มอื่นๆ พบว่าค่าเฉลี่ย TME ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$, ANOVA) ระหว่างวันสุดท้ายของการฝึกและภายหลังการผ่าตัดชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่องเป็นเวลา 20 วัน และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย TME ภายหลังการผ่าตัดชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่องเป็นเวลา 20 วัน ระหว่างกลุ่ม พบว่าหนูทดลองกลุ่ม Control $A\beta$ เท่านั้นที่มีค่าเฉลี่ย TME สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Control sham ดังรูปที่ 23



รูปที่ 23 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย total memory error (TME) ของหนูกลุ่มควบคุมทั้ง control sham และ control AB กับกลุ่มที่ได้รับชาเขียว (GT AB) และกากชา (GTB AB) ในช่วงก่อนการผ่าตัด (Pre-operation) กับวันที่ 20 หลังการผ่าตัด (D20 Post-operation) เพื่อฉีดน้ำเกลือ (sham) หรือ amyloid β peptides (AB) เข้าในสมองส่วน enthorinal cortex (# หมายถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับวันสุดท้ายก่อนการผ่าตัด และ * หมายถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control sham)

ค่าเฉลี่ย RME ในวันสุดท้ายของการฝึกก่อนผ่าตัดของกลุ่ม Control Sham, Control AB, GT AB และ GTB AB คิดเป็นค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.7 ± 0.2 , 1.1 ± 0.3 , 0.6 ± 0.2 และ 0.7 ± 0.3 ครั้งตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$, ANOVA) ในขณะที่ภายหลังจากการผ่าตัดเป็นเวลา 10 วันพบว่า RME ของหนูในกลุ่ม Control Sham, Control AB, GT AB และ GTB AB เป็น 0.1 ± 0.1 , 2.2 ± 0.2 , 1.3 ± 0.2 และ 0.5 ± 0.2 ครั้งตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบภายในกลุ่มระหว่างวันสุดท้ายของการฝึกและภายหลังจากการผ่าตัดชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่องเป็นเวลา 10 วันของหนูในแต่ละกลุ่มโดยใช้ Student's paired t-test พบว่าหนูในกลุ่ม Control AB และกลุ่ม GT AB มีค่าเฉลี่ย RME เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติภายหลังจากการผ่าตัดชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่อง ส่วนกลุ่ม Control Sham และ GTB AB พบว่าค่าเฉลี่ย RME ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างวันสุดท้ายของการฝึกและภายหลังจากการผ่าตัดชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่องเป็นเวลา 10 วัน และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย RME ภายหลังจากการผ่าตัดชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่องเป็นเวลา 10 วัน ระหว่างกลุ่ม พบว่าหนู

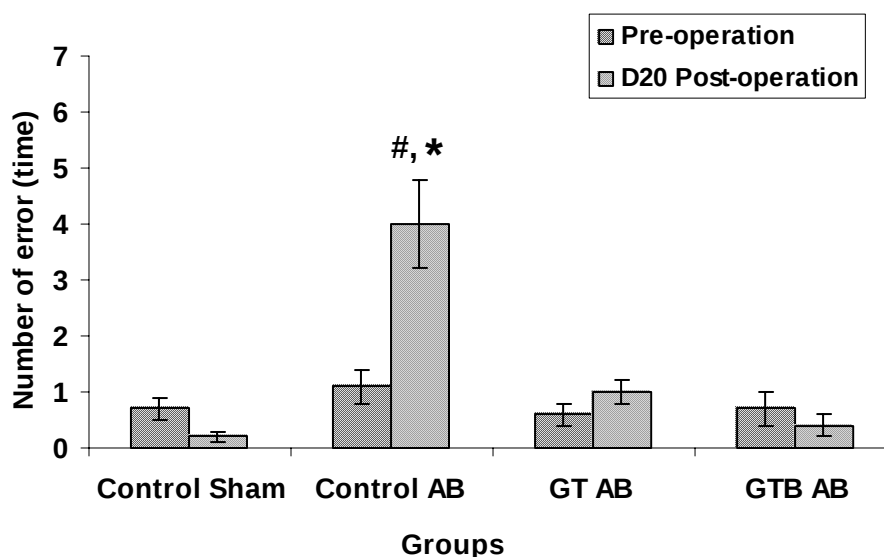
ทดลองกลุ่ม Control A β และ GT A β มีค่าเฉลี่ย RME สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Control sham ดังรูปที่ 24



รูปที่ 24 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย reference memory error (RME) ของหนูกลุ่มควบคุมทั้ง control sham และ control AB กับกลุ่มที่ได้รับชาเขียว (GT AB) และกากชา (GTB AB) ในช่วงก่อนการผ่าตัด (Pre-operation) กับวันที่ 10 หลังการผ่าตัด (D10 Post-operation) เพื่อฉีดน้ำเกลือ (sham) หรือ amyloid β peptides (AB) เข้าในสมองส่วน enthorinal cortex (# หมายถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับวันสุดท้ายก่อนการผ่าตัด และ * หมายถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control sham)

ภายหลังการผ่าตัดชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่องเป็นเวลา 20 วัน พบว่าค่าเฉลี่ย RME ของหนูหมุ่มกลุ่ม Control sham, Control A β , GT A β และ GTB A β เป็น 0.2 ± 0.1 , 4.0 ± 0.8 , 1.0 ± 0.2 และ 0.4 ± 0.2 ครั้ง ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบภายในกลุ่มระหว่างวันสุดท้ายของการฝึกและภายหลังการผ่าตัดชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่องเป็นเวลา 20 วันของหนูหมุ่มแต่ละกลุ่มโดยใช้ Paired t-test พบว่าหนูหมุ่มกลุ่ม Control A β มีค่าเฉลี่ย RME เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติภายหลังการผ่าตัดชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่อง ส่วนกลุ่มอื่นๆ พบว่าค่าเฉลี่ย RME ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ระหว่างวันสุดท้ายของการฝึกและภายหลังการผ่าตัดชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่องเป็นเวลา 20 วัน และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย RME ภายหลังการผ่าตัดชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่องเป็นเวลา 20 วัน ระหว่างกลุ่ม

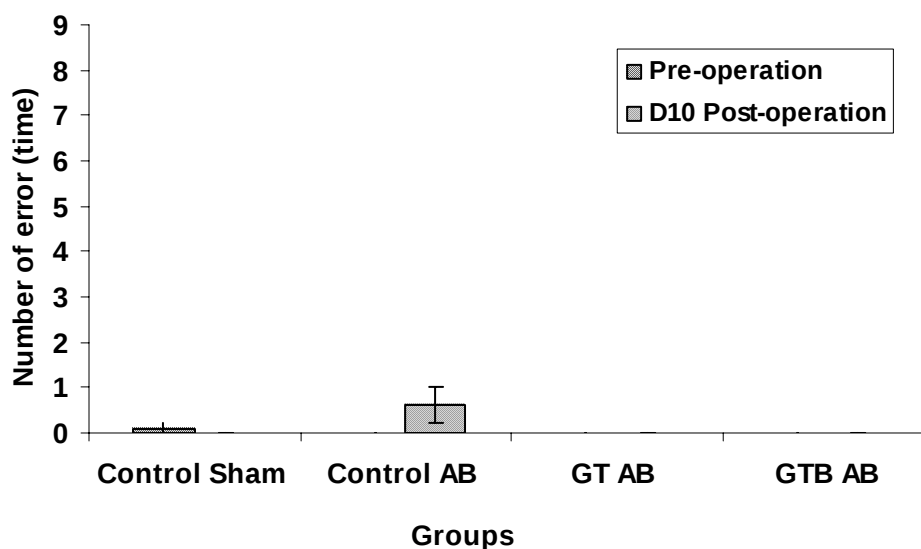
พบว่าหนูทดลองกลุ่ม Control AB เท่านั้นที่มีค่าเฉลี่ย RME สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Control sham ดังรูปที่ 25



รูปที่ 25 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย reference memory error (RME) ของหนูกลุ่มควบคุมทั้ง control sham และ control AB กับกลุ่มที่ได้รับชาเขียว (GT AB) และกากชา (GTB AB) ในช่วงก่อนการผ่าตัด (Pre-operation) กับวันที่ 20 หลังการผ่าตัด (D20 Post-operation) เพื่อฉีดน้ำเกลือ (sham) หรือ amyloid β peptides (AB) เข้าในสมองส่วน enthorinal cortex (# หมายถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับวันสุดท้ายก่อนการผ่าตัด และ * หมายถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control sham)

ค่าเฉลี่ย WME ในวันสุดท้ายของการฝึกก่อนการผ่าตัดชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่องของหนูหม่มกลุ่ม Control Sham, Control A β , GT A β และ GTB A β เป็น 0.1 ± 0.1 , 0.0 ± 0.0 , 0.0 ± 0.0 และ 0.0 ± 0.0 ครั้ง ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ภายหลังการผ่าตัดชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่องเป็นเวลา 10 วันพบว่าค่าเฉลี่ย WME ของหนูหม่มกลุ่ม Control Sham, Control A β , GT A β และ GTB A β เป็น 0.0 ± 0.0 , 0.6 ± 0.4 , 0.0 ± 0.0 และ 0.0 ± 0.0 ครั้ง ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบภายในกลุ่มระหว่างวันสุดท้ายของการฝึกและภายหลังการผ่าตัดชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่องเป็นเวลา 10 วันของหนูหม่มแต่ละกลุ่มโดยใช้ Student's paired t-test พบว่าหนูหม่มทุกกลุ่ม มีค่าเฉลี่ย WME ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ภายหลังการผ่าตัดชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่อง ($P > 0.05$, ANOVA) และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย WME ภายหลังการผ่าตัดชักนำให้เกิดภาวะความจำ

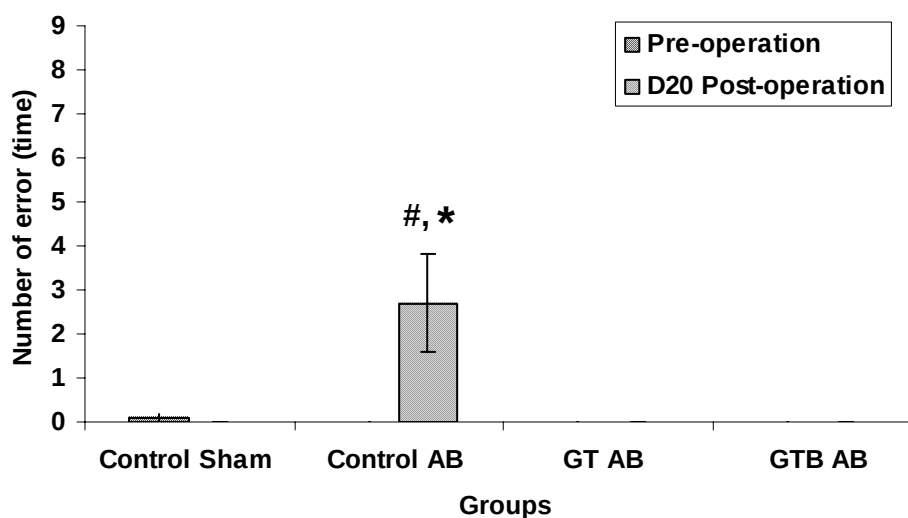
บกพร่องเป็นเวลา 10 วัน ระหว่างกลุ่ม พบว่าหนูทดลองทุกกลุ่ม มีค่าเฉลี่ย WME ไม่แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Control sham ($P > 0.05$, ANOVA) ดังรูปที่ 26



รูปที่ 26 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย working memory error (WME) ของหนูกลุ่มควบคุมทั้ง control sham และ control AB กับกลุ่มที่ได้รับชาเขียว (GT AB) และกากชา (GTB AB) ในช่วงก่อนการผ่าตัด (Pre-operation) กับวันที่ 10 หลังการผ่าตัด (D10 Post-operation) เพื่อฉีดน้ำเกลือ (sham) หรือ amyloid β peptides (AB) เข้าในสมองส่วน enthorinal cortex (# หมายถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับวันสุดท้ายก่อนการผ่าตัด และ * หมายถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control sham)

ภายหลังการผ่าตัดชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่องเป็นเวลา 20 วัน พบว่า ค่าเฉลี่ย WME ของหนูกลุ่ม Control sham, Control A β , GT A β และ GTB A β เป็น 0.0 ± 0.0 , 2.7 ± 1.1 , 0.0 ± 0.0 และ 0.0 ± 0.0 ครั้ง ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบภายในกลุ่มระหว่างวันสุดท้ายของการฝึกและภายหลังการผ่าตัดชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่องเป็นเวลา 20 วันของหนูแต่ละกลุ่มโดยใช้ Student's paired t-test พบว่าหนูกลุ่ม Control A β มีค่าเฉลี่ย WME เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติภายหลังการผ่าตัดชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่อง ส่วนกลุ่มอื่นๆ พบว่าค่าเฉลี่ย WME ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างวันสุดท้ายของการฝึกและภายหลังการผ่าตัดชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่องเป็นเวลา 20 วัน และเมื่อเปรียบเทียบ WME ภายหลังการผ่าตัดชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่องเป็นเวลา 20 วัน ระหว่าง

กลุ่ม พบว่าหนูทดลองกลุ่ม Control AB เท่านั้นที่มีค่าเฉลี่ย WME สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Control sham ดังรูปที่ 27

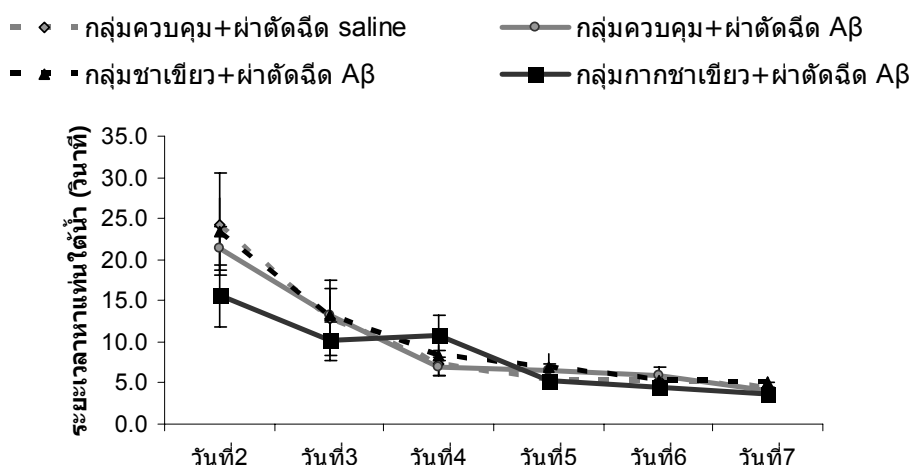


รูปที่ 27 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย working memory error (WME) ของหนูกลุ่มควบคุมทั้ง control sham และ control AB กับกลุ่มที่ได้รับชาเขียว (GT AB) และกากชา (GTB AB) ในช่วงก่อนการผ่าตัด (Pre-operation) กับวันที่ 20 หลังการผ่าตัด (D20 Post-operation) เพื่อฉีดน้ำเกลือ (sham) หรือ amyloid β peptides (AB) เข้าในสมองส่วน enthorinal cortex (# หมายถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับวันสุดท้ายก่อนการผ่าตัด และ * หมายถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control sham)

3.3 ผลการทดสอบความจำด้วย MWM ในหนูหนุ่มก่อนการผ่าตัด

ผลการศึกษาในหนูหนุ่มพบว่า หนูทดลองทุกกลุ่มใช้เวลาในการหาแท่นได้น้ำ ไกล่เคียงกันและมีค่าลดลงตามวันที่ทำการฝึก คือกลุ่ม Control Sham มีค่าเฉลี่ยของ escape latency ตั้งแต่วันที่ 2 ของการฝึกจนถึงวันสุดท้ายของการฝึกเป็นดังนี้ 24.3 ± 6.2 , 12.9 ± 4.5 , 7.4 ± 1.5 , 5.2 ± 0.4 , 5.2 ± 0.8 , 4.5 ± 0.6 วินาที ตามลำดับ และกลุ่ม Control AB มีค่าเฉลี่ยของ escape latency ตั้งแต่วันที่ 2 ของการฝึกจนถึงวันสุดท้ายของการฝึกเป็นดังนี้ 21.4 ± 2.7 , 13.2 ± 3.3 , 6.9 ± 0.9 , 6.6 ± 0.8 , 5.9 ± 1.1 , 4.1 ± 0.3 วินาที และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดชาเขียวและถูกชักให้เกิดภาวะความจำบกพร่อง (GT AB) มีค่าเฉลี่ยของ Escape latency ตั้งแต่วันที่ 2 ของการฝึกจนถึงวันสุดท้ายของการฝึกเป็นดังนี้ 23.4 ± 4.1 , 13.3 ± 2.2 , 8.3 ± 1.2 , 6.9 ± 1.6 , 5.3 ± 0.8 , 5.0 ± 0.6

วินาที ตามลำดับ และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากชาเขียวและถูกชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่อง (GTB A β) มีค่าเฉลี่ยของ Escape latency ตั้งแต่วันที่ 2 ของการฝึกจนถึงวันสุดท้ายของการฝึก เป็นดังนี้ 15.6 ± 3.8 , 10.1 ± 2.4 , 10.7 ± 2.5 , 5.2 ± 0.7 , 4.4 ± 0.6 , 3.7 ± 0.4 วินาที ตามลำดับ โดยทุกกลุ่มมีค่าเฉลี่ยของ Escape latency ตั้งแต่วันที่ 2 ของการฝึกจนถึงวันสุดท้ายของการฝึกไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในรูปที่ 28



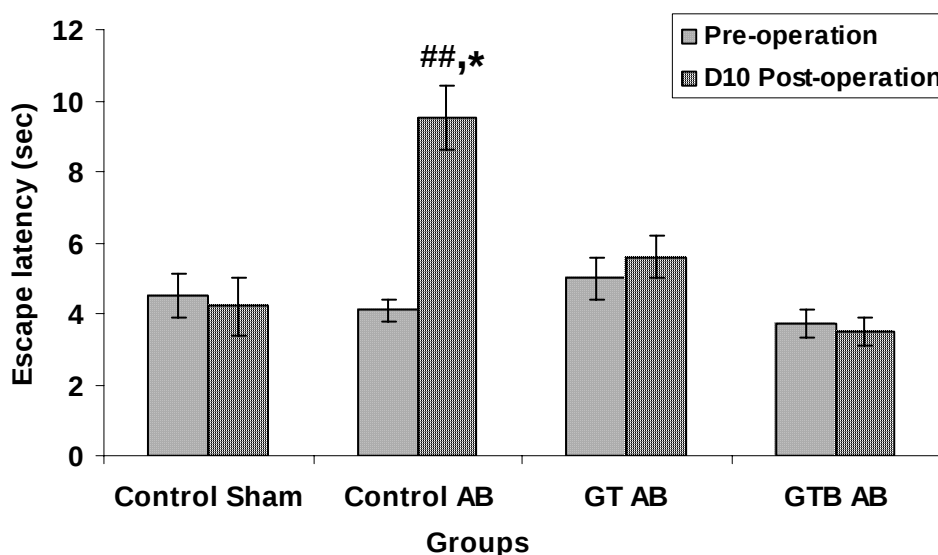
รูปที่ 28 ลักษณะ profile ของการเรียนรู้ของหนูหนุ่มแต่ละกลุ่มในช่วงฝึก 6 วัน ก่อนการผ่าตัดชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่อง

โดยการศึกษาในหนูหนุ่มภายหลังการฝึกให้หาแท่นได้น้ำดังที่กล่าวมาข้างต้นแล้ว ใน สัปดาห์ที่ 9 ของการวิจัย หนูหนุ่มทุกกลุ่มถูกผ่าตัด โดยมีเพียงหนูหนุ่มกลุ่ม Control Sham เท่านั้น ที่ถูกผ่าตัดโดยไม่มีการชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่องแต่มีการฉีด saline แทน ส่วนหนูหนุ่ม กลุ่ม Control A β , GT A β และ GTB A β ถูกผ่าตัดชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่องโดยใช้ amyloid beta ซึ่งภายหลังที่หนูหนุ่มทุกกลุ่มได้รับการผ่าตัดไปแล้วเป็นเวลา 10 วัน และ 20 วัน ผู้วิจัยทำการบันทึกระยะเวลาในการหาแท่นได้น้ำของหนูหนุ่มแต่ละกลุ่มโดยนำผลที่ได้มา เปรียบเทียบกับระยะเวลาในการหาแท่นได้น้ำของวันสุดท้ายในช่วงฝึกข้างต้น รวมกับนำข้อมูลที่ได้ ทั้งหมดมาเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มดังนี้

3.3.1 เปรียบเทียบเวลาที่หนูหนุ่มแต่ละกลุ่มใช้ในการหาแท่นได้น้ำ (Escape latency) ระหว่างก่อนการผ่าตัดและภายหลังการผ่าตัดเป็นเวลา 10 วัน

เมื่อเปรียบเทียบค่า escape latency เฉลี่ยภายในกลุ่มระหว่างก่อนและภายหลังการผ่าตัดเป็นเวลา 10 วัน พบว่า กลุ่มควบคุม Control Sham มี escape latency เฉลี่ยก่อนการผ่าตัด

เท่ากับ 4.5 ± 0.6 วินาที และภายหลังการผ่าตัดเท่ากับ 4.2 ± 0.8 วินาที, กลุ่ม GT A β มี escape latency เฉลี่ยก่อนการผ่าตัดเท่ากับ 5.0 ± 0.6 วินาที และ หลัง ผ่าตัดเท่ากับ 5.6 ± 0.6 วินาที และ กลุ่ม GTB A β มีค่า escape latency เฉลี่ยก่อนผ่าตัดเท่ากับ 3.7 ± 0.4 วินาที และ หลังผ่าตัดเท่ากับ 3.5 ± 0.4 วินาที ซึ่งทุกกลุ่มที่กล่าวมา ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบข้อมูลดังกล่าวภายในกลุ่ม ส่วนกลุ่ม Control A β group มีค่า escape latency เฉลี่ย ก่อนผ่าตัดเท่ากับ 4.1 ± 0.3 วินาที และหลังผ่าตัด เท่ากับ 9.5 ± 0.9 วินาที ซึ่งมีความแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ $P \leq 0.001$ ส่วนการเปรียบเทียบ escape latency เฉลี่ยก่อน การผ่าตัดระหว่างกลุ่มพบว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$, ANOVA) และหากเปรียบเทียบ escape latency เฉลี่ยระหว่างกลุ่มหลังผ่าตัดพบว่า กลุ่ม Control A β มี escape latency เฉลี่ยมากกว่ากลุ่ม Control Sham อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังรูปที่ 29



รูปที่ 29 เปรียบเทียบระยะเวลาในการหาแท่นได้น้ำระหว่างก่อนและภายหลังการผ่าตัด เป็นเวลา 10 วัน ของหนูหนุ่มกลุ่มต่างๆ

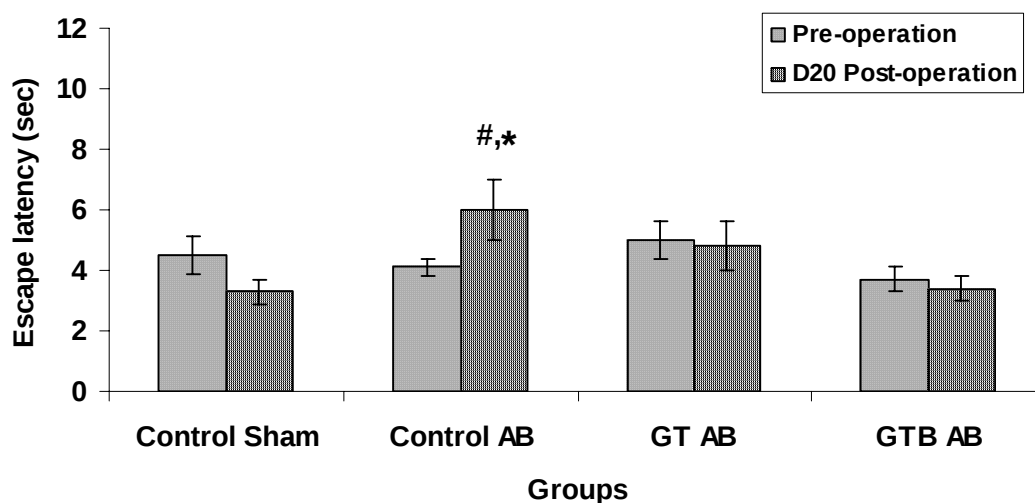
หมายเหตุ โดยใช้ paired t-test เปรียบเทียบก่อน – หลังการผ่าตัด และใช้ one-way ANOVA ตามด้วย Dunnett's post hoc test ในการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม

มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P \leq 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับวันสุดท้ายก่อนการผ่าตัด

* มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Control sham

3.3.2 เปรียบเทียบเวลาที่หนูทดลองใช้ในการหาแท่นได้น้ำ (escape latency) ภายในกลุ่มระหว่างก่อนการผ่าตัดและภายหลังการผ่าตัดเป็นเวลา 20 วัน

เมื่อเปรียบเทียบ escape latency เฉลี่ยภายในกลุ่มระหว่างก่อนการผ่าตัดและภายหลังการผ่าตัดเป็นเวลา 20 วัน พบว่า กลุ่ม Control Sham มี escape latency เฉลี่ยก่อนและหลังผ่าตัดเท่ากับ 4.5 ± 0.6 และ 3.3 ± 0.4 วินาทีตามลำดับ กลุ่ม GT A β มีค่า escape latency เฉลี่ยก่อนและหลังผ่าตัดเท่ากับ 5.0 ± 0.6 และ 4.8 ± 0.8 วินาทีตามลำดับ และกลุ่ม GTB A β มี escape latency เฉลี่ยก่อนและหลังการผ่าตัดเท่ากับ 3.7 ± 0.4 และ 3.4 ± 0.4 วินาทีตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบข้อมูลดังกล่าวภายในกลุ่ม ส่วนกลุ่ม Control A β มี escape latency เฉลี่ยก่อนและหลังผ่าตัดเท่ากับ 4.1 ± 0.3 และ 6.0 ± 1.0 วินาทีตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ $P = 0.048$ ส่วนการเปรียบเทียบ escape latency ก่อนการผ่าตัดระหว่างกลุ่มทดลองต่างๆ พบว่า ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามค่า escape latency เฉลี่ย หลังการผ่าตัด 20 วัน ของกลุ่ม Control A β สูงกว่าค่าที่ได้จากกลุ่ม Control Sham อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังรูปที่ 30



รูปที่ 30 เปรียบเทียบระยะเวลาในการหาแท่นได้น้ำระหว่างก่อนและภายหลังการผ่าตัด เป็นเวลา 20 วัน ของหนูหนุ่มกลุ่มต่างๆ

หมายเหตุ การเปรียบเทียบผลก่อน – หลังการผ่าตัดใช้ paired t-test และการเปรียบเทียบผลระหว่างหนูแต่ละกลุ่มใช้ ANOVA ตามด้วย Dunnett's post hoc test

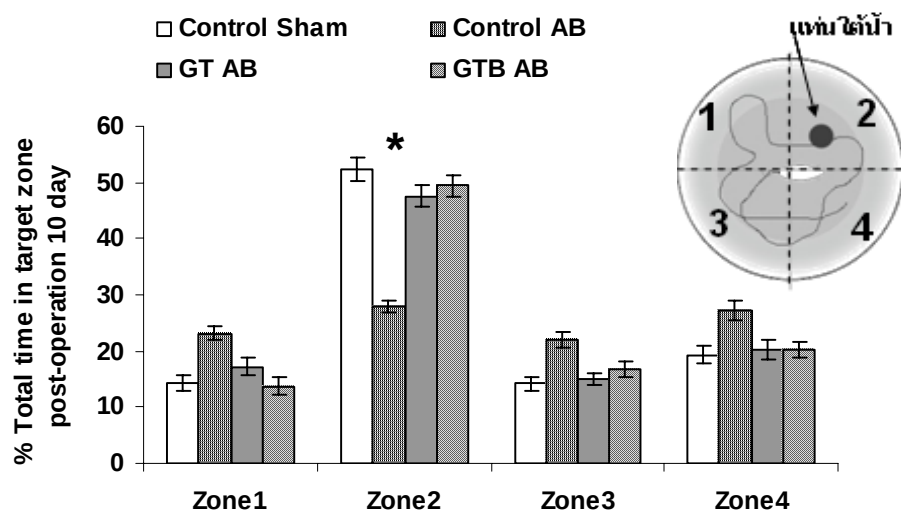
#มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับวันสุดท้ายก่อนการผ่าตัด

*มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Control sham

3.3.3 Probe Trial Test

Probe Trial Test เป็นการทดสอบความสามารถในการเรียนรู้และความจำที่เกี่ยวข้องกับสถานที่โดยใช้อุปกรณ์และวิธีการเช่นเดียวกันกับการทดสอบ escape latency โดยวิธี Morris Water Maze แต่การทดสอบด้วยวิธี Probe Trial Test จะนำแท่นได้น้ำออกและจับเวลาที่หนูทดลองว่ายน้ำอยู่ในแต่ละ zone ของอ่างน้ำทรงกลมโดยคิดค่าเวลาที่หนูทดลองอยู่ในแต่ละ zone เป็นเปอร์เซ็นต์จากเวลาทั้งหมด 90 วินาทีที่หนูทดลองว่ายน้ำ หนูทดลองทุกกลุ่มจะได้รับการทดสอบเวลาที่หนูทดลองอยู่ในแต่ละ zone ของอ่างน้ำทรงกลม ภายหลังจากที่มีการนำแท่นได้น้ำออก (probe trial) ซึ่งจะถูกทดสอบในวันถัดจากวันที่ 14 ของการฝึกหัดหาแท่นได้น้ำของหนูแก่ตามธรรมชาติและในวันที่ 11 และ 21 ภายหลังจากการผ่าตัดชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่องในหนูหนุ่ม ซึ่งเป็นการตรวจสอบความสามารถในการดึงข้อมูลเก่าหรือค่า retention memory

หนูทดลองทุกกลุ่มจะได้รับการทดสอบเวลาที่หนูทดลองอยู่ในแต่ละ zone ของอ่างน้ำทรงกลม ภายหลังจากที่มีการนำแท่นได้น้ำออก (probe trial) ซึ่งจะถูกทดสอบวันที่ 11 และ 21 ภายหลังจากการผ่าตัดชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่องในหนูหนุ่ม ซึ่งเป็นการตรวจสอบความสามารถในการดึงข้อมูลเก่าหรือค่า retention memory

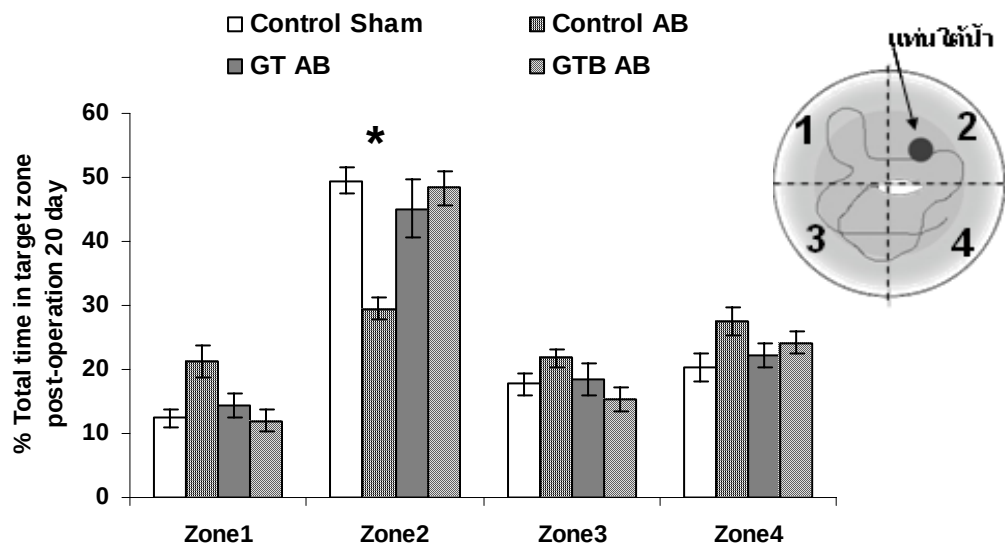


รูปที่ 31 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์เวลาที่หนูหนุ่มว่ายน้ำในแต่ละ zone ภายหลังจากการผ่าตัด 10 วัน โดยที่ Zone2 เป็นโซนที่เคยมีแท่นได้น้ำ

หมายเหตุ * แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Control sham) (repeated measures one-way ANOVA ตามด้วย Dunnett's post hoc test)

ในหนูหนุ่มภายหลังการผ่าตัดชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่องเป็นเวลา 10 วัน พบว่า หนูหนุ่มกลุ่ม Control Sham ใช้เวลาในการว่ายน้ำใน zone ที่ 1, zone ที่ 2, zone ที่ 3 และ zone ที่ 4 เป็นดังนี้ $14.2 \pm 1.5\%$, $52.3 \pm 2.1\%$, $14.2 \pm 1.3\%$ และ $19.3 \pm 1.6\%$ ตามลำดับ และหนู Control A β ใช้เวลาในการว่ายน้ำใน zone ที่ 1, 2, 3 และ 4 เป็นดังนี้ $23.1 \pm 1.2\%$, $28.0 \pm 1.1\%$, $21.8 \pm 1.4\%$ และ $27.1 \pm 1.8\%$ ตามลำดับ และหนูกลุ่ม GT A β ใช้เวลาในการว่ายน้ำใน zone ที่ 1, 2, 3 และ 4 เป็นดังนี้ $17.2 \pm 1.6\%$, $47.6 \pm 1.8\%$, $15.0 \pm 1.1\%$ และ $20.2 \pm 1.6\%$ ตามลำดับ และหนูกลุ่ม GTB A β ใช้เวลาในการว่ายน้ำใน zone ที่ 1, zone ที่ 2, zone ที่ 3 และ zone ที่ 4 เป็นดังนี้ $13.7 \pm 1.5\%$, $49.4 \pm 2.0\%$, $16.8 \pm 1.3\%$ และ $20.1 \pm 1.4\%$ ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าหนูทดลองกลุ่ม Control AB ใช้เวลาในการว่ายน้ำอยู่ใน zone ที่เคยมีแท่นได้น้ำมาก่อน (zone 2) น้อยกว่ากลุ่มควบคุม Control Sham อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนกลุ่มอื่นๆ พบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม ดังรูปที่ 31

ในขณะที่หนูหนุ่มภายหลังการผ่าตัดชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่องเป็นเวลา 20 วัน พบว่าหนูหนุ่มกลุ่ม Control Sham ใช้เวลาในการว่ายน้ำใน zone ที่ 1, zone ที่ 2, zone ที่ 3, และ zone ที่ 4 เป็นดังนี้ $12.4 \pm 1.4\%$, $49.5 \pm 2.1\%$, $17.8 \pm 1.7\%$ และ $20.3 \pm 2.1\%$ ตามลำดับ และหนูทดลองกลุ่ม Control A β ใช้เวลาในการว่ายน้ำใน zone ที่ 1, 2, 3, และ 4 เป็นดังนี้ $21.3 \pm 2.5\%$, $29.4 \pm 1.7\%$, $21.8 \pm 1.5\%$ และ $27.5 \pm 2.2\%$ ตามลำดับ และหนูกลุ่ม GT A β ใช้เวลาในการว่ายน้ำใน zone ที่ 1, zone ที่ 2, zone ที่ 3, และ zone ที่ 4 เป็นดังนี้ $14.3 \pm 1.8\%$, $45.1 \pm 4.4\%$, $18.5 \pm 2.5\%$ และ $22.1 \pm 1.9\%$ ตามลำดับ และหนูกลุ่ม GTB AB ใช้เวลาในการว่ายน้ำใน zone ที่ 1, zone ที่ 2, zone ที่ 3, และ zone ที่ 4 เป็นดังนี้ $12.0 \pm 1.6\%$, $48.4 \pm 2.7\%$, $15.4 \pm 1.8\%$ และ $24.2 \pm 1.7\%$ ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าหนูทดลองกลุ่ม Control A β ใช้เวลาในการว่ายน้ำอยู่ใน zone ที่เคยมีแท่นได้น้ำมาก่อน (zone 2) น้อยกว่ากลุ่มควบคุม Control Sham อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนกลุ่มอื่นๆ พบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม ดังรูปที่ 32

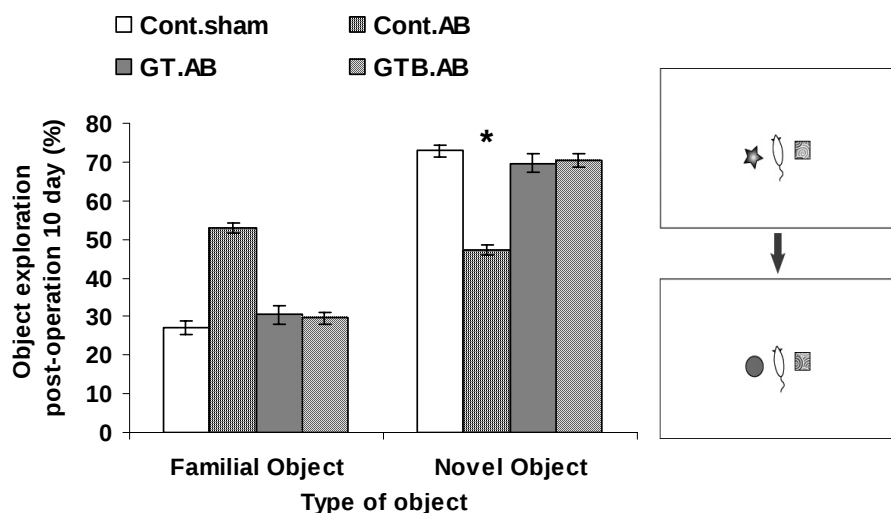


รูปที่ 32 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์เวลาที่หนูหนุ่มว่ายน้ำในแต่ละ zone ภายหลังการผ่าตัด 20 วัน

หมายเหตุ * แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ (ANOVA ตามด้วย Dunnett's post hoc test) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Control sham)

3.3 ผลการทดสอบความจำด้วยวิธี Novel object recognition test

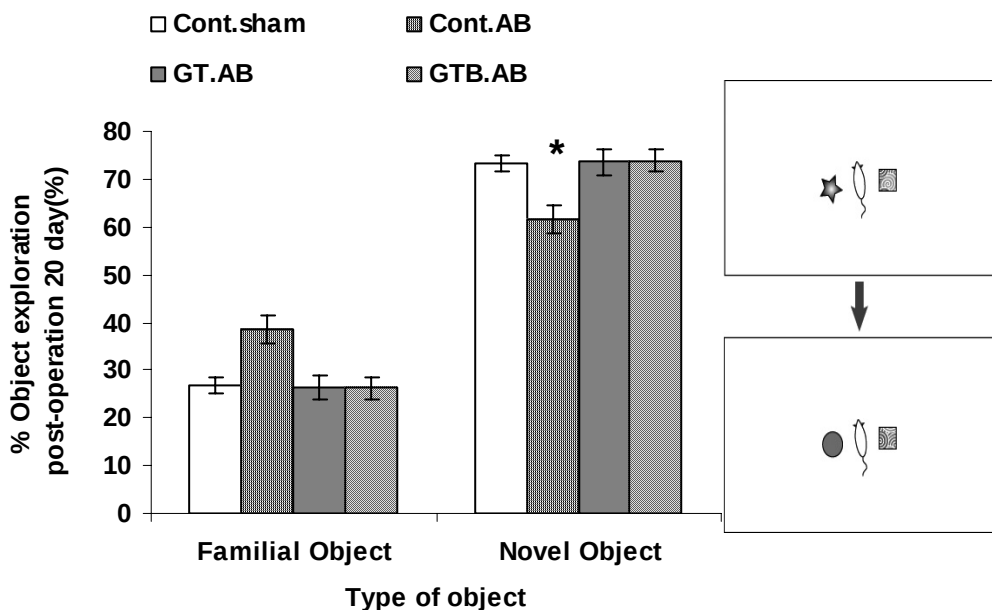
ภายหลังการผ่าตัดชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่องเป็นเวลา 10 วัน หนูหนุ่มกลุ่มควบคุม (Control Sham), หนูหนุ่มกลุ่ม Control A β , หนูหนุ่มกลุ่ม GT A β และหนูหนุ่มกลุ่ม GTB A β มีเปอร์เซ็นต์การสำรวจวัตถุที่เคยพบเป็น $27.2 \pm 1.6\%$, $52.8 \pm 1.3\%$, $30.4 \pm 2.4\%$ และ $29.6 \pm 1.6\%$ ตามลำดับ และมีเปอร์เซ็นต์การสำรวจวัตถุใหม่ (recognition index) เป็น $72.8 \pm 1.6\%$, $47.2 \pm 1.3\%$, $69.6 \pm 2.4\%$ และ $70.4 \pm 1.6\%$ ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าเปอร์เซ็นต์การสำรวจวัตถุใหม่ของหนูหนุ่มกลุ่มควบคุม Control AB น้อยกว่าหนูหนุ่มกลุ่มควบคุม Control Sham อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนหนูหนุ่มกลุ่มอื่นๆ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังรูปที่ 33



รูปที่ 33 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การสำรวจวัตถุใหม่ของหนูหนุ่มภายหลังผ่าตัดเป็นเวลา 10 วัน

หมายเหตุ * แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ (ANOVA ตามด้วย Dunnett's post hoc test) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Control sham)

ภายหลังการผ่าตัดชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่องเป็นเวลา 20 วัน พบว่าหนูหนุ่มกลุ่มควบคุม (Control Sham), หนูหนุ่มกลุ่ม Control A β , หนูหนุ่มกลุ่ม GT A β และหนูหนุ่มกลุ่ม GTB A β มีเปอร์เซ็นต์การสำรวจวัตถุที่เคยพบเป็น $26.7 \pm 1.7\%$, $38.5 \pm 3.0\%$, $26.4 \pm 2.7\%$ และ $26.2 \pm 2.3\%$ ตามลำดับ และมีเปอร์เซ็นต์การสำรวจวัตถุใหม่ (recognition index) เป็น $73.3 \pm 1.7\%$, $61.5 \pm 3.0\%$, $73.6 \pm 2.7\%$ และ $73.8 \pm 2.3\%$ ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าเปอร์เซ็นต์การสำรวจวัตถุใหม่ของหนูหนุ่มกลุ่มควบคุม Control A β น้อยกว่าหนูหนุ่มกลุ่มควบคุม Control Sham อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนหนูหนุ่มกลุ่มอื่นๆ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังรูปที่ 34



รูปที่ 34 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การสำรวจวัตถุใหม่ของหนูหนูหม่งภายหลังผ่าตัดเป็นเวลา 20 วัน
หมายเหตุ * แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ (ANOVA ตาม
ด้วย Dunnett's post hoc test) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Control sham)

4. ผลการทดสอบชาเขียวและกากชาเขียวต่อการเพิ่มการเรียนรู้และความจำในหนูแก่ตาม ธรรมชาติ

4.1 ผลการทดสอบการเรียนรู้และความจำในหนูแก่ตามธรรมชาติด้วยวิธี RAM

ผลการทดลองในหนูแก่ตามธรรมชาติ พบว่ากลุ่มควบคุม, กลุ่มที่ได้รับสารสกัดชาเขียว และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดกากชาเขียว มีจำนวนรวมของการผิดพลาด (TME) ในการเข้าไปหาอาหาร ใน RAM เป็น ดังตารางที่ 10 ซึ่งค่าที่ได้ในแต่ละกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) จากการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย ANOVA

ผลการทดลองพบว่าหนูแก่ตามธรรมชาติกลุ่มควบคุม, กลุ่มหนูแก่ที่ได้รับสารสกัดชาเขียว และกลุ่มหนูแก่ที่ได้รับสารสกัดกากชาเขียว มีจำนวนครั้งของการผิดพลาด WME ในการเข้าไปหาอาหารใน RAM เป็นดังตารางที่ 12 ซึ่งในค่าที่ได้ในแต่ละกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) จากการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย ANOVA

ตารางที่ 10 แสดงค่าจำนวนรวมของการผิดพลาด TME ในการเข้าไปหาอาหารใน RAM และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยของหนูแก่ตามธรรมชาติแต่ละกลุ่ม

ลำดับที่	กลุ่ม Old control	กลุ่ม Old +GT	กลุ่ม Old + GTB
1	4.3 ± 0.6	4.7 ± 0.7	6.0 ± 0.9
2	3.9 ± 0.7	4.5 ± 0.3	4.8 ± 0.5
3	3.3 ± 0.4	3.9 ± 0.5	3.4 ± 0.4
4	2.7 ± 0.4	3.4 ± 0.4	3.0 ± 0.4
5	2.3 ± 0.4	2.6 ± 0.4	3.5 ± 0.6
6	2.4 ± 0.3	2.7 ± 0.4	2.4 ± 0.4

สำหรับ Reference memory error (RME) ผลการทดลองพบว่าหนูแก่ตามธรรมชาติ กลุ่มควบคุม, กลุ่มหนูแก่ที่ได้รับสารสกัดชาเขียว และกลุ่มหนูแก่ที่ได้รับสารสกัดกากชาเขียว มีจำนวนครั้งของการผิดพลาด RME ในการเข้าไปหาอาหารใน RAM เป็น ดังตารางที่ 11 ซึ่งในค่าที่ได้ในแต่ละกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) จากการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย ANOVA

ตารางที่ 11 แสดงค่าจำนวนครั้งของการผิดพลาด RME ในการเข้าไปหาอาหารใน RAM และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยของหนูแก่ตามธรรมชาติแต่ละกลุ่ม

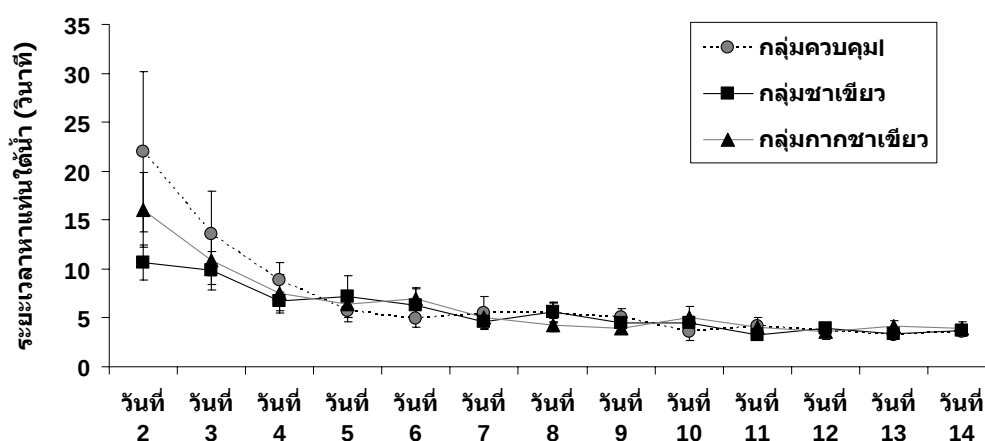
ลำดับที่	กลุ่ม Old control	กลุ่ม Old +GT	กลุ่ม Old + GTB
1	3.0 ± 0.2	3.1 ± 0.4	3.8 ± 0.5
2	2.7 ± 0.4	3.2 ± 0.2	3.7 ± 0.3
3	2.7 ± 0.3	2.7 ± 0.3	2.8 ± 0.3
4	2.2 ± 0.3	2.7 ± 0.2	2.4 ± 0.3
5	2.0 ± 0.3	2.3 ± 0.3	2.9 ± 0.4
6	2.1 ± 0.3	2.5 ± 0.3	2.2 ± 0.3

ตารางที่ 12 ค่าเฉลี่ยของจำนวนการผิดพลาด WME ในการเข้าไปหาอาหารใน RAM และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยของหนูแก่ตามธรรมชาติแต่ละกลุ่ม

ลำดับที่	กลุ่ม Old control	กลุ่ม Old +GT	กลุ่ม Old + GTB
1	1.4 ± 0.4	1.6 ± 0.3	2.2 ± 0.4
2	1.1 ± 0.4	1.3 ± 0.2	1.2 ± 0.2
3	0.7 ± 0.1	1.1 ± 0.2	0.7 ± 0.1
4	0.5 ± 0.2	0.8 ± 0.2	0.6 ± 0.2
5	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.7 ± 0.3
6	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1

4.2 ผลการทดสอบการเรียนรู้และความจำในหนูแก่ตามธรรมชาติ โดยวิธี MWM

จากผลการศึกษาในหนูแก่ตามธรรมชาติพบว่า หนูแก่ตามธรรมชาติทุกกลุ่มใช้เวลาในการหาแท่นได้น้ำใกล้เคียงกันและลดลงเป็นลำดับ โดยทุกกลุ่มมีค่าเฉลี่ยของ escape latency ตั้งแต่ วันที่ 2 ของการฝึกจนถึงวันสุดท้ายของการฝึกไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในตาราง 13 และรูปที่ 35



รูปที่ 35 แสดงระยะเวลาการหาแท่นได้น้ำของหนูแก่ตามธรรมชาติแต่ละกลุ่มในช่วงฝึก 13 วัน

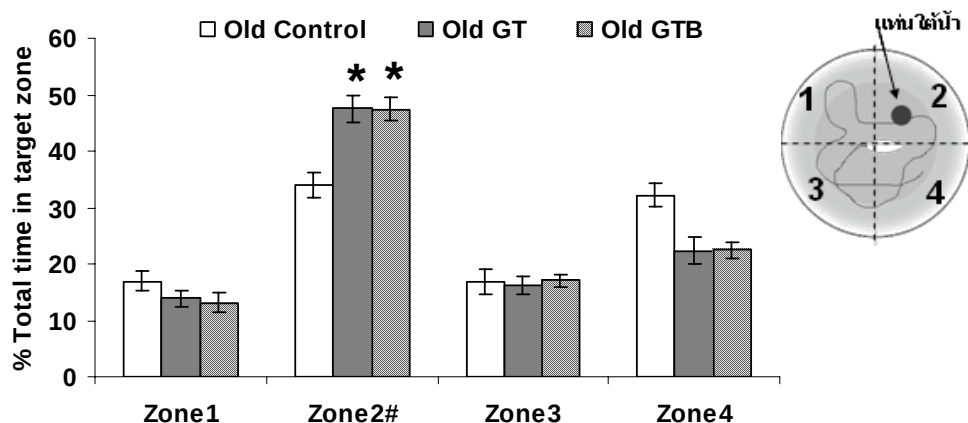
ตาราง 13 แสดงระยะเวลาการหาแท่นได้น้ำของหนูแก่ตามธรรมชาติแต่ละกลุ่มในช่วงฝึก MWM วันที่ 2-14 และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยของหนูหนุ่มแต่ละกลุ่ม

Training Day	กลุ่ม Old control	กลุ่ม Old +GT	กลุ่ม Old + GTB
2	22.0 ± 8.2	10.6 ± 1.8	16.1 ± 3.8
3	13.6 ± 4.3	9.9 ± 2.0	10.8 ± 2.4
4	8.9 ± 1.7	6.7 ± 1.0	7.5 ± 1.9
5	5.7 ± 1.1	7.2 ± 2.1	6.4 ± 1.4
6	4.9 ± 0.9	6.3 ± 1.6	6.9 ± 1.1
7	5.5 ± 1.7	4.6 ± 0.6	5.0 ± 0.8
8	5.5 ± 0.9	5.6 ± 1.0	4.3 ± 0.7
9	5.0 ± 1.0	4.5 ± 0.5	4.0 ± 0.5
10	3.6 ± 0.9	4.5 ± 0.6	5.1 ± 1.1
11	4.2 ± 0.9	3.3 ± 0.3	4.0 ± 0.3
12	3.7 ± 0.8	3.9 ± 0.6	3.6 ± 0.5
13	3.3 ± 0.4	3.4 ± 0.3	4.1 ± 0.6
14	3.6 ± 0.5	3.7 ± 0.4	3.9 ± 0.7

4.3 Probe Trial Test

จากผลการทดลองในหนูแก่ตามธรรมชาติพบว่า หนูกลุ่มควบคุมใช้เวลาในการว่ายน้ำใน zone ที่ 1, 2 (zone ที่เคยมีแท่นได้น้ำมาก่อน), 3 และ 4 เป็นดังนี้ $17.0 \pm 1.9\%$, $34.0 \pm 2.2\%$, $16.8 \pm 2.1\%$ และ $32.2 \pm 2.2\%$ ตามลำดับ และหนูแก่กลุ่มที่ได้รับสารสกัดชาเขียว ใช้เวลาในการว่ายน้ำใน zone ที่ 1, 2, 3 และ 4 เป็นดังนี้ $13.9 \pm 1.4\%$, $47.5 \pm 2.4\%$, $16.2 \pm 1.6\%$ และ $22.3 \pm 2.3\%$ ตามลำดับ และหนูแก่กลุ่มที่ได้รับสารสกัดกากชาเขียว ใช้เวลาในการว่ายน้ำใน zone ที่ 1, 2, 3 และ 4 ดังนี้ $13.1 \pm 1.6\%$, $47.4 \pm 2.1\%$, $17.1 \pm 1.1\%$ และ $22.4 \pm 1.5\%$ ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์ของค่าเฉลี่ยระยะเวลาที่หนูทดลองว่ายอยู่ในโซนที่ 2 (Zone2#) ซึ่งเป็นโซนที่เคยมีแท่นได้น้ำมาก่อน ของหนูกลุ่มควบคุม, กลุ่มที่ได้รับชาเขียว และกลุ่มที่ได้รับกากชาเขียว มีค่าเท่ากับ $34 \pm 2.2\%$, $47.5 \pm 2.4\%$ และ $47.4 \pm 2.1\%$ ตามลำดับ และจากผลวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า หนูแก่ในกลุ่มชาเขียวและกลุ่มกากชาเขียวมีความสามารถในการเรียนรู้และความจำ

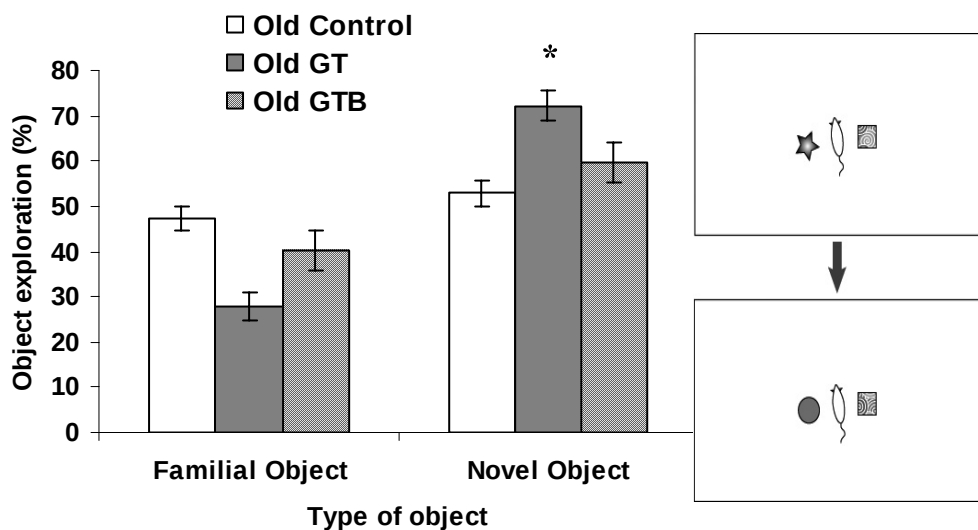
เกี่ยวกับสถานที่ที่สัตว์หนูแท่งกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (repeated measures one-way ANOVA ตามด้วย Dunnett's post hoc test) ดังรูปที่ 36



รูปที่ 36 แสดงการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์เวลาที่หนูแท่งตามธรรมชาติว่ายน้ำในแต่ละโซน
หมายเหตุ * แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ (repeated measures one-way ANOVA ตามด้วย Dunnett's post hoc test) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Old Control)

4.4 ผลการทดสอบความสามารถในการจดจำเกี่ยวกับสิ่งของในหนูแท่งตามธรรมชาติด้วยวิธี Novel Object recognition

ในหนูแท่งตามธรรมชาติ พบว่า หนูแท่งตามธรรมชาติกลุ่มควบคุม, หนูแท่งตามธรรมชาติกลุ่มที่ได้รับสารสกัดชาเขียว และหนูแท่งตามธรรมชาติกลุ่มที่ได้รับสารสกัดกากชาเขียว มีเปอร์เซ็นต์การสำรวจวัตถุที่เคยพบ เป็น $47.2 \pm 2.7\%$, $27.8 \pm 3.2\%$ และ $40.3 \pm 4.4\%$ ตามลำดับ และมีเปอร์เซ็นต์การสำรวจวัตถุใหม่ (recognition index) เป็น $52.8 \pm 2.7\%$, $72.2 \pm 3.2\%$ และ $59.7 \pm 4.4\%$ ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าเปอร์เซ็นต์การสำรวจวัตถุใหม่ของหนูแท่งตามธรรมชาติกลุ่มที่ได้รับชาเขียวมากกว่าหนูแท่งตามธรรมชาติกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนหนูแท่งตามธรรมชาติกลุ่มที่ได้รับกากชาเขียวพบว่ามีเปอร์เซ็นต์การสำรวจวัตถุใหม่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากหนูแท่งตามธรรมชาติกลุ่มควบคุม ดังรูปที่ 37



รูปที่ 37 แสดงการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การสำรวจวัตถุใหม่ของหนูแก่ตามธรรมชาติที่ได้รับเฉพาะตัวทำละลาย (Old control) หนูกลุ่มที่ได้รับชาเขียว (Old GT) และกลุ่มที่ได้รับกากชาเขียว (Old GTB) (* หมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม [Old Control] เมื่อทดสอบด้วย ANOVA ตามด้วย Dunnett's post hoc test)

5. ผลของสารสกัดชาเขียวและกากชาเขียว ต่อการทำงานของเอนไซม์ SOD และ GPx ในหนูหนุ่ม

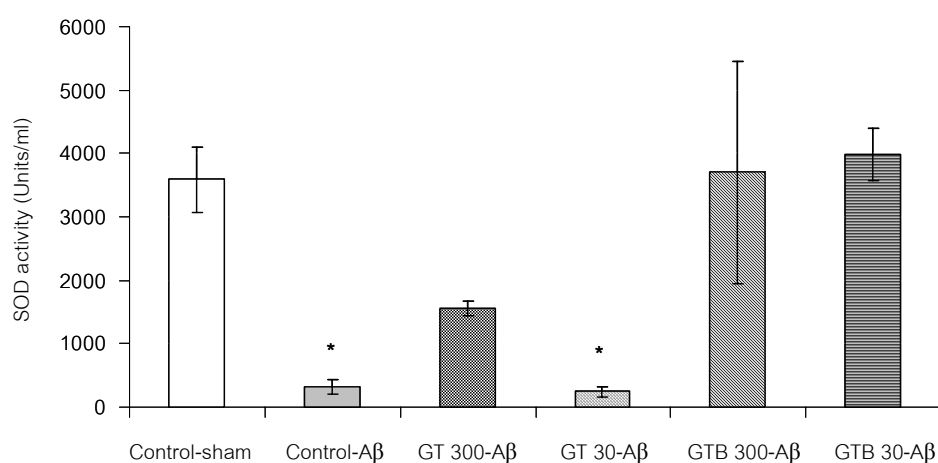
หลังจากการทดสอบพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำหนูทุกกลุ่มเสร็จสมบูรณ์ หนูเหล่านี้จะถูกทำให้ตายอย่างสงบ ด้วยการฉีดยาสลบ Nembutal เข้าช่องท้อง แล้วนำมาตัดคอด้วยเครื่อง decapitator (Harvard Apparatus) จากนั้นทำการแยกเนื้อสมองส่วน hippocampus ออกมาวัดค่าระดับการทำงานของเอนไซม์ SOD และ GPx ในสมองส่วนนี้

5.1 กลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดชาเขียวและกากชาเขียวต่อระดับการทำงานของเอนไซม์ SOD

จากผลการทดลองพบว่าหนูทดลองกลุ่มควบคุมที่ถูกฉีด $A\beta_{25-35}$ เข้าไปยังบริเวณโพรงสมอง (cerebral ventricle) เพื่อชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่อง (กลุ่ม Control- $A\beta$) (n=8) และทดลองกลุ่มที่ได้รับชาเขียวขนาด 30 มก./กก. (กลุ่ม GT 30- $A\beta$) (n=8) น้ำหนักตัว และถูกฉีด $A\beta_{25-35}$ peptides เข้าไปยังบริเวณโพรงสมองเพื่อชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่อง มีค่าเฉลี่ยของระดับการทำงานของเอนไซม์ SOD ในสมองส่วน hippocampus เท่ากับ 321.40 ± 111.65 และ 242.90 ± 83.20 ยูนิท/มล. ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับน้ำและถูกฉีดน้ำเกลือซึ่งเป็นตัวทำลายของสาร $A\beta_{25-35}$ peptides เข้าไปยังบริเวณโพรงสมอง (กลุ่ม Control-sham) (n=14) ที่มีค่าเฉลี่ยของระดับการทำงานของเอนไซม์ SOD ในสมองส่วน hippocampus เท่ากับ 3588.87 ± 512.94 ยูนิท/มล. ($P < 0.05$, ANOVA ตามด้วย Dunnett's pos hoc test) ในขณะที่ทดลองกลุ่มที่ได้รับชาเขียวขนาด 300 (กลุ่ม GT 300- $A\beta$) (n=10) มก./กก. น้ำหนักตัว และกากชาเขียวขนาด 30 (กลุ่ม GTB 30- $A\beta$) (n=10) และ 300 (กลุ่ม GTB 300- $A\beta$) (n=5) มก./กก. น้ำหนักตัว และถูกฉีด $A\beta_{25-35}$ peptides เข้าไปยังบริเวณโพรงสมองเพื่อชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่อง มีค่าเฉลี่ยของระดับการทำงานของเอนไซม์ SOD ในสมองส่วน hippocampus เท่ากับ $1,562.67 \pm 116.75$, $3,989.40 \pm 407.25$ และ $3,699.03 \pm 1744.93$ ยูนิท/มล. ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกับหนูทดลอง Control-sham อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$, one-way repeated measures ANOVA) แสดงดังภาพที่ 38 ค่าเฉลี่ยของระดับการทำงานของเอนไซม์ SOD ในสมองส่วน hippocampus ของหนูทดลองแต่ละกลุ่มแสดงดังตารางที่ 14

จากผลการทดลองพบว่าหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับน้ำกลั่นและชาเขียวขนาด 30 มก./กก น้ำหนักตัว และถูกผ่าตัดเพื่อฉีด $A\beta_{25-35}$ peptides เข้าไปยังบริเวณโพรงสมอง มีค่าเฉลี่ยของระดับ

การทำงานของเอนไซม์ SOD ในสมองส่วน hippocampus น้อยกว่าหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับน้ำกลั่น และถูกผ่าตัดเพื่อฉีดน้ำเกลือเข้าไปยังบริเวณโพรงสมอง (กลุ่ม Control-Sham) อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับชาเขียวขนาด 300 และกากชาเขียวขนาด 30 และ 300 มก./กก. น้ำหนักตัว มีค่าเฉลี่ยของระดับการทำงานของเอนไซม์ SOD ในสมองส่วน hippocampus ใกล้เคียงกับหนูทดลองกลุ่ม Control-Sham (ดังตารางที่ 14)



รูปที่ 38 แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของระดับการทำงานของเอนไซม์ SOD ในสมองส่วน hippocampus ของหนูทดลองแต่ละกลุ่ม (* = $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม [Control Sham] เมื่อทดสอบด้วย repeated measures one-way ANOVA ตามด้วย Dunnett's post hoc test)

ตารางที่ 14 ค่าเฉลี่ยของระดับการทำงานของเอนไซม์ SOD ในสมองส่วน hippocampus ของหนูทดลองแต่ละกลุ่ม

กลุ่ม	ระดับการทำงานของเอนไซม์ SOD (ยูนิต/มล.)
Control-sham	3588.87±512.94
Control-Aβ	321.40±111.65*
GT 300- Aβ	1,562.67±116.75
GT 30- Aβ	242.90±83.20*
GTB 300- Aβ	3,699.03±1744.93
GTB 30- Aβ	3,989.40±407.25

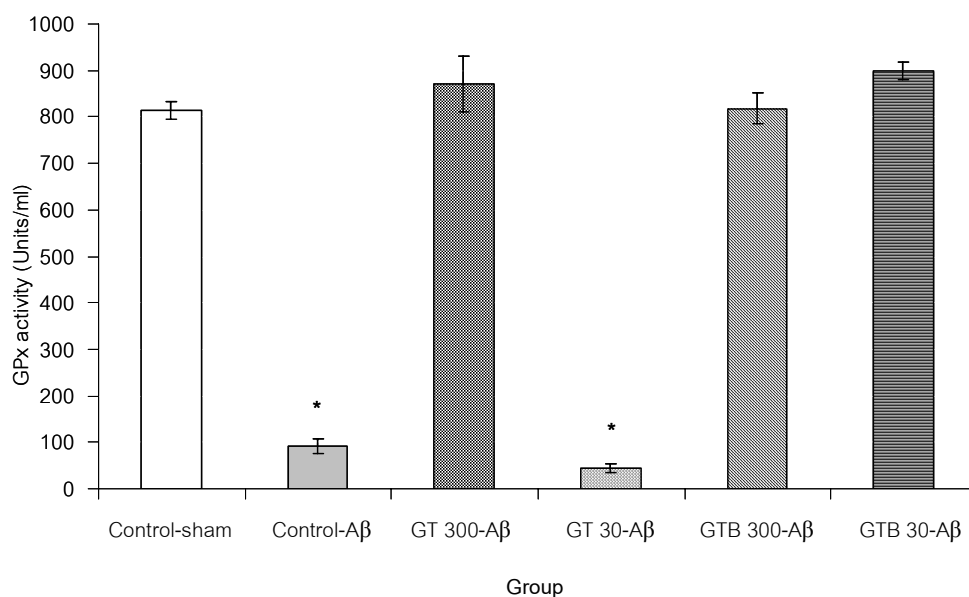
หมายเหตุ * = $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Control-Sham (ANOVA ตามด้วย Dunnett's pos hoc test)

5.2 ผลของสารสกัดชาเขียวและกากชาเขียวต่อระดับการทำงานของเอนไซม์ GPx

จากผลการทดลองพบว่าหนูทดลองกลุ่ม Control- A β และ กลุ่ม GT 30- A β และถูกฉีด มีค่าเฉลี่ยของระดับการทำงานของเอนไซม์ GPx ในสมองส่วน hippocampus เท่ากับ 91.33 ± 18.96 และ 43.42 ± 8.87 ยูนิท/มล. ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูทดลองกลุ่ม Control-sham ที่มีค่าเฉลี่ยของระดับการทำงานของเอนไซม์ GPx ในสมองส่วน hippocampus เท่ากับ 812.66 ± 17.11 ยูนิท/มล. ($P < 0.05$, ANOVA ตามด้วย Dunnett's pos hoc test) ในขณะที่หนูทดลองกลุ่ม GT 300- A β กลุ่ม GTB 30- A β และกลุ่ม GTB 300- A β มีค่าเฉลี่ยของระดับการทำงานของเอนไซม์ GPx ในสมองส่วน hippocampus เท่ากับ 870.71 ± 60.22 , 899.74 ± 18.28 และ 817.94 ± 32.32 ยูนิท/มล. ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกับหนูทดลองกลุ่ม Control-sham อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$, ANOVA) รูปที่ 39 ค่าเฉลี่ยของระดับการทำงานของเอนไซม์ GPx ในสมองส่วน hippocampus ของหนูทดลองแต่ละกลุ่มแสดงดังตารางที่ 15

จากผลการทดลองพบว่าหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับน้ำกลั่นและชาเขียวขนาด 30 มก./กก น้ำหนักตัว และถูกผ่าตัดเพื่อฉีด A β_{25-35} peptides เข้าไปยังบริเวณโพรงสมอง มีค่าเฉลี่ยของระดับการทำงานของเอนไซม์ GPx ในสมองส่วน hippocampus น้อยกว่าหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับน้ำกลั่น และถูกผ่าตัดเพื่อฉีดน้ำเกลือเข้าไปยังบริเวณโพรงสมอง (กลุ่ม Control-Sham) อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับชาเขียวขนาด 300 และกากชาเขียวขนาด 30 และ 300 มก./กก. น้ำหนักตัว มีค่าเฉลี่ยของระดับการทำงานของเอนไซม์ GPx ในสมองส่วน hippocampus ใกล้เคียงกับหนูทดลองกลุ่ม Control-Sham

จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่า A β_{25-35} peptides ส่งผลให้เกิดการลดระดับการทำงานของเอนไซม์ SOD และ GPx ในสมองส่วน hippocampus และสารสกัดชาเขียวขนาด 300 และกากชาเขียวขนาด 30 และ 300 มก./กก. น้ำหนักตัว อาจมีฤทธิ์ในการเสริมการทำงานหรือเพิ่มปริมาณเอนไซม์ SOD และ GPx ในสมองส่วน hippocampus



รูปที่ 39 แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของระดับการทำงานของเอนไซม์ GPx ในสมองส่วน hippocampus ของหนูทดลองแต่ละกลุ่ม (* = $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม [Control Sham] เมื่อทดสอบด้วย ANOVA ตามด้วย Dunnett's post hoc test)

ตารางที่ 15 แสดงค่าเฉลี่ยของระดับการทำงานของเอนไซม์ GPx ในสมองส่วน hippocampus ของหนูทดลองแต่ละกลุ่ม

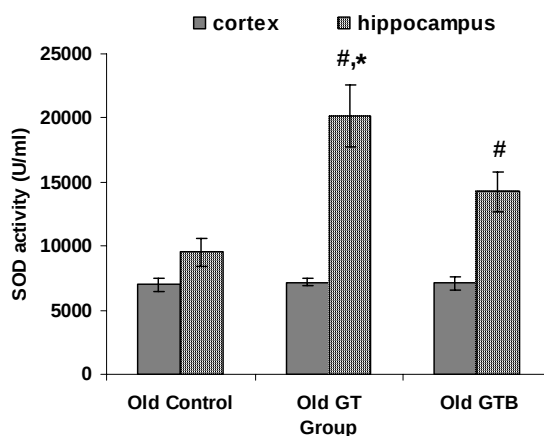
กลุ่มหนูทดลอง	ค่าระดับการทำงานของเอนไซม์ GPx (ยูนิต/มล.)
Control-sham	812.66±17.11
Control-Aβ	91.33±18.96*
GT 300- Aβ	870.71±60.22
GT 30- Aβ	43.42±8.87*
GTB 300- Aβ	817.94±32.32
GTB 30- Aβ	899.74±18.2

* = $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Control-Sham (ANOVA ตามด้วย Dunnett's pos hoc test)

6. ผลของสารสกัดชาเขียวและกากชาเขียว ต่อการทำงานของเอนไซม์ SOD ในหนูแก่ตามธรรมชาติ

6.1 ผลของต่อระดับการทำงานของเอนไซม์ SOD

ในหนูแก่ตามธรรมชาติพบว่าหนูแก่กลุ่มควบคุม, กลุ่มที่ได้รับชาเขียว และกลุ่มที่ได้รับกากชาเขียว มีค่าระดับการทำงานของเอนไซม์ SOD ในสมองส่วน hippocampus เท่ากับ $9,514.1 \pm 1,119.1$, $20,190.6 \pm 2,428.7$ และ $14,257.5 \pm 1547.2$ หน่วย/มิลลิลิตร ตามลำดับ และในส่วน cortex เท่ากับ 6980.2 ± 562.9 , 7199.5 ± 254.8 และ 7124.6 ± 502.4 หน่วย/มล. ตามลำดับ ซึ่งผลการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ระดับการทำงานของ SOD ในสมองส่วน hippocampus ของหนูแก่ที่ได้รับชาเขียวมีค่ามากกว่าค่าที่วัดได้จากสมองส่วน hippocampus ของหนูแก่กลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนระดับการทำงานของ SOD ในสมองส่วน hippocampus ของหนูแก่กลุ่มที่ได้รับกากชาเขียวพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และเมื่อเปรียบเทียบค่าการทำงานของเอนไซม์ SOD ระหว่างบริเวณของสมองพบว่า มีเพียงหนูแก่กลุ่มควบคุมเท่านั้นที่มีค่าการทำงานของเอนไซม์ SOD ในสมองส่วน hippocampus และเปลือกสมองที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนหนูแก่ที่ได้รับชาเขียว และกลุ่มที่ได้รับกากชาเขียว มีค่าการทำงานของเอนไซม์ SOD ในสมองส่วน hippocampus มากกว่าส่วน cortex อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังรูปที่ 40



รูปที่ 40 แสดงการเปรียบเทียบการทำงานของเอนไซม์ SOD ในสมองส่วน hippocampus และ cortex ของหนูแก่ตามธรรมชาติแต่ละกลุ่ม (* = $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม; # = $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างบริเวณของสมอง ; ANOVA ตามด้วย Dunnett's post hoc test ในการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม และใช้ Student's paired t-test ในการเปรียบเทียบระหว่างบริเวณของสมอง)

7. ผลของชาเขียวและกากชาเขียวที่ถูกดึงคาเฟอีนออกต่อจำนวนครั้งการเคลื่อนไหว และความเร็วในการเคลื่อนไหว

สืบเนื่องจากมีรายงานผลการวิจัยเมื่อไม่นานมานี้ที่ได้ระบุว่าคาเฟอีนในชาเขียวมีส่วนช่วยในการเรียนรู้และความจำ (Arendash et al., 2009; Cao et al., 2009) ดังนั้นทีมผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาผลของสารสกัดชาเขียวและกากชาเขียวที่ถูกดึงคาเฟอีนออก (decaffeinated GT and GTB) ต่อพฤติกรรมการเคลื่อนไหวโดยบันทึกจำนวนครั้งการเคลื่อนไหว และความเร็วในการเคลื่อนไหว เปรียบเทียบกับสารสกัดชาเขียวและกากชาเขียวปกติ ที่มีทำการทดลองก่อนหน้านี้แล้ว พบว่ามีผลในการกระตุ้นระบบประสาทส่วนกลาง คือขนาดความเข้มข้น 300 มก/กก

จากผลการทดลองพบว่าในช่วงก่อนป้อนน้ำหรือสารสกัด (Pre-Rx) หนูทดลองกลุ่ม GT 300-C กลุ่ม GTB 300-C มีจำนวนครั้งในการเคลื่อนไหวไม่แตกต่างกับหนูทดลองกลุ่ม Control หรือกลุ่มที่ได้รับชาเขียวและกากชาเขียวปกติ หลังจากป้อนน้ำหรือสารสกัด หนูทดลองกลุ่ม GT 300-C และ GTB 300-C มีค่าเฉลี่ยจำนวนครั้งในการเคลื่อนไหว ในช่วง 0-10 ช่วง 10-20 ช่วง 20-30 ช่วง 30-40 นาที ช่วง 40-50 นาที และช่วง 50-60 นาที น้อยกว่าหนูทดลองกลุ่ม GT 300 กลุ่ม GTB 300 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังรูปที่ 41 (กราฟบน) และตารางที่ 16

สำหรับค่าเฉลี่ยความเร็วในการเคลื่อนไหว ในช่วงก่อนป้อนน้ำหรือสารสกัด (Pre-Rx) หนูทดลองกลุ่ม GT 300-C กลุ่ม GTB 300-C มีค่าเฉลี่ยความเร็วในการเคลื่อนไหวไม่แตกต่างกับหนูทดลองกลุ่ม Control หรือกลุ่มที่ได้รับชาเขียวและกากชาเขียวปกติ หลังจากป้อนน้ำหรือสารสกัด หนูทดลองกลุ่ม GT 300-C และ GTB 300-C มีค่าเฉลี่ยความเร็วในการเคลื่อนไหว ในช่วง 0-10 ช่วง 10-20 ช่วง 20-30 ช่วง 30-40 นาที และช่วง 40-50 นาที น้อยกว่าหนูทดลองกลุ่ม GT 300 กลุ่ม GTB 300 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ช่วง 50-60 นาที ค่าความเร็วเฉลี่ยของทุกกลุ่มมีค่าไม่แตกต่างกัน ดังรูปที่ 41 (กราฟล่าง) และตารางที่ 17

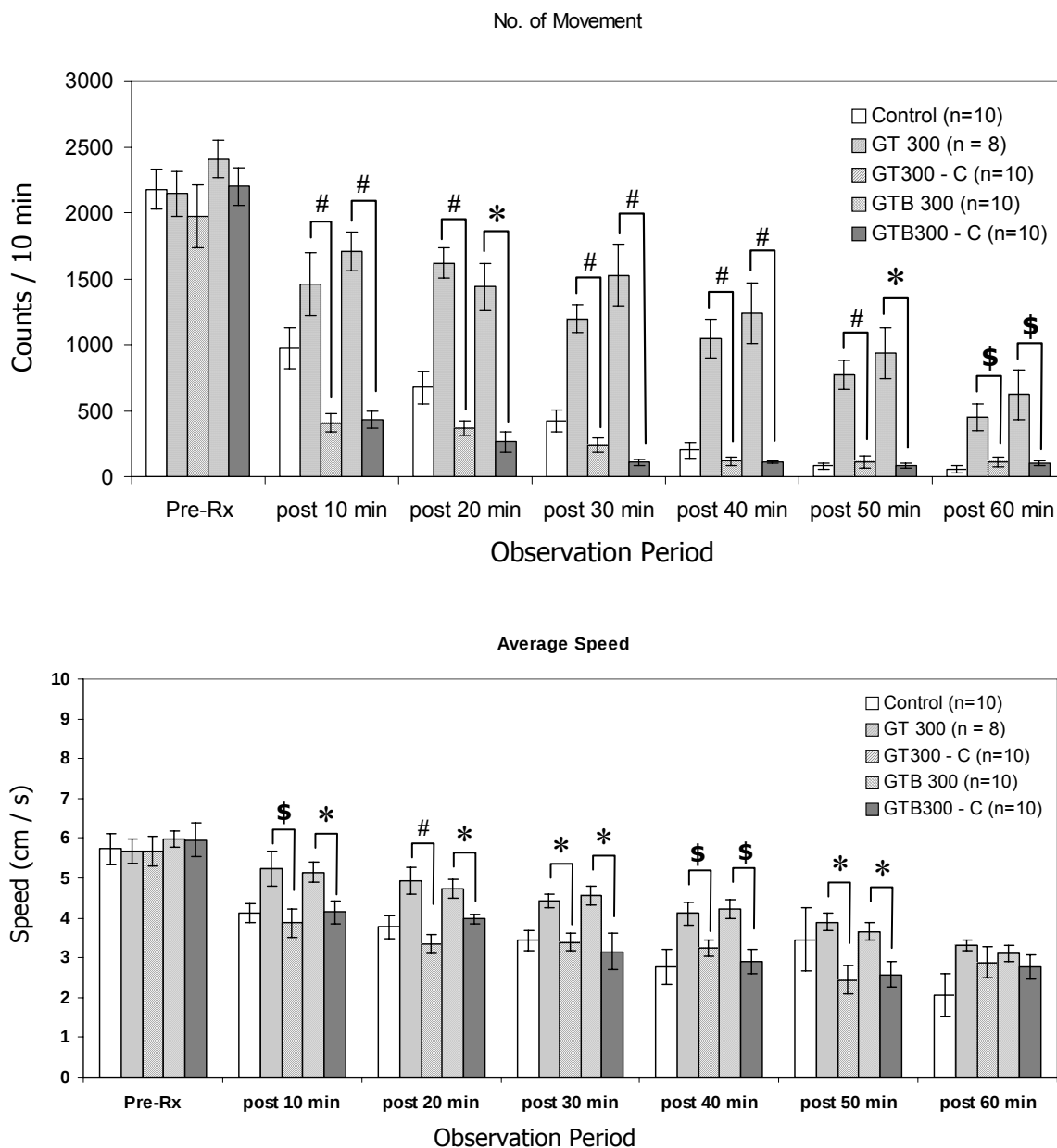
จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าชาเขียวและกากชาเขียวขนาด 300 มก./กก. น้ำหนักตัว เมื่อให้แก่สัตว์ทดลองเพียงครั้งเดียว มีฤทธิ์กระตุ้นระบบประสาทส่วนกลางที่ส่งผลต่อการแสดงออกของพฤติกรรมการเคลื่อนไหวทั้งเพิ่มจำนวนครั้งและความเร็วของการเคลื่อนไหว ส่วนชาเขียวและกากชาเขียวที่ถูกดึงคาเฟอีนออกที่ขนาดเท่ากันคือ 300 มก./กก. น้ำหนักตัว เมื่อให้แก่สัตว์ทดลองเพียงครั้งเดียว พบว่าไม่มีฤทธิ์กระตุ้นระบบประสาทส่วนกลางที่ส่งผลต่อการแสดงออกของพฤติกรรมการเคลื่อนไหว

ตารางที่ 16 แสดงค่าเฉลี่ยจำนวนครั้งการเคลื่อนไหวทั้งหมดของหนูในแต่ละกลุ่ม (ครั้ง/10 นาที)

Group	Pre-Rx	0-10 min (counts/10 min)	10-20 min (counts/10 min)	20-30 min (counts/10 min)	30-40 min (counts/10 min)	40-50 min (counts/10 min)	50-60 min (counts/10 min)
Control	2177.50±148.71	974.00±157.76	678.10±124.20	149.30±81.68	198.00±56.01	81.70±22.47	55.90±28.87
GT 300	2142.63±167.62	1455.63±239.26	1616.63±115.61	1193.63±106.11	1045.75±150.90	770.75±111.92	453.00±101.19
GT 300-C	2156.3±161.05	427.9±77.01	387.00±53.64	254.7±56.58	124.5±35.2	108.1±52.32	117.2±37.63
GTB300	2406.90±144.31	1706.80±148.29	1437.30±179.40	1525.71±236.08	1240.60±231.19	936.60±190.94	620.30±190.32
GTB300-C	2198.1±143.37	432.9±61.44	264.3±79.36	106.3±20.27	109.0±11.91	82.0±16.74	97.6±19.01

ตารางที่ 17 แสดงค่าเฉลี่ยความเร็วในการเคลื่อนไหวของหนูในแต่ละกลุ่ม (เซนติเมตร/วินาที)

Group	Pre-Rx	0-10 min	10-20 min	20-30 min	30-40 min	40-50 min	50-60 min
Control	5.73±0.38	4.12±0.24	3.77±0.29	3.44±0.25	2.77±0.44	3.46±0.80	2.05±0.54
GT 300	5.68±0.31	5.24±0.43	4.94±0.33	4.41±0.17	4.11±0.28	3.89±0.22	3.31±0.12
GT 300-C	5.26±0.41	3.92±0.38	3.42±0.25	3.36±0.25	3.26±0.24	2.42±0.4	3.02±0.4
GTB 300	5.97±0.21	5.15±0.25	4.74±0.23	4.57±0.24	4.21±0.24	3.66±0.21	3.10±0.20
GTB 300-C	5.95±0.42	4.15±0.29	3.97±0.12	3.15±0.45	2.89±0.3	2.58±0.33	2.77±0.29

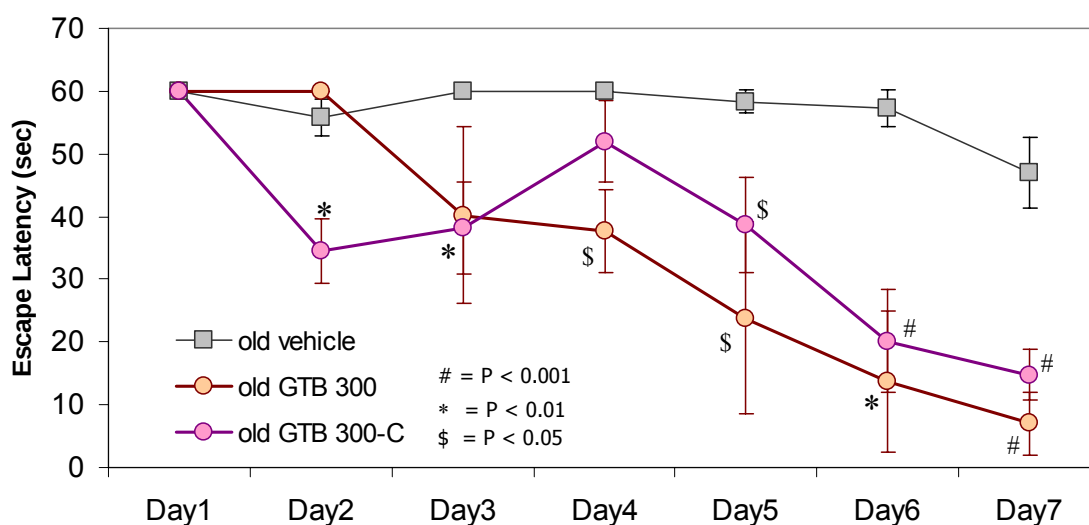


รูปที่ 41 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยจำนวนครั้งการเคลื่อนไหว และความเร็วเฉลี่ยของหนูทดลองที่ได้รับ น้ำกลั่น (Control) ชาเขียว 300 มก/กก (GT300) และกากชาเขียวปกติ 300 มก/กก (GTB300) เปรียบเทียบกับชาเขียวที่ไม่มีคาเฟอีน 300 มก/กก (GT300-C) และกากชาเขียวที่ไม่มีคาเฟอีน 300 มก/กก (GTB300-C) ในช่วงก่อน (Pre-Rx) และหลังได้รับน้ำกลั่นหรือสารสกัด โดยแสดงเป็น ค่าเฉลี่ยจำนวนครั้งของการเคลื่อนไหว (กราฟบน) ความเร็วเฉลี่ย (กราฟล่าง) ต่อ 10 นาที เป็น เวลาทั้งหมด 60 นาที (# = $P < 0.001$, * = $P < 0.01$, \$ = $P < 0.05$ สถิติที่ใช้คือ Student's unpaired t- test)

8. ผลของชาเขียวและกากชาเขียวที่ถูกดองคาเฟอีนออกต่อการฟื้นฟูภาวะความจำบกพร่องในหนูถีบจักร

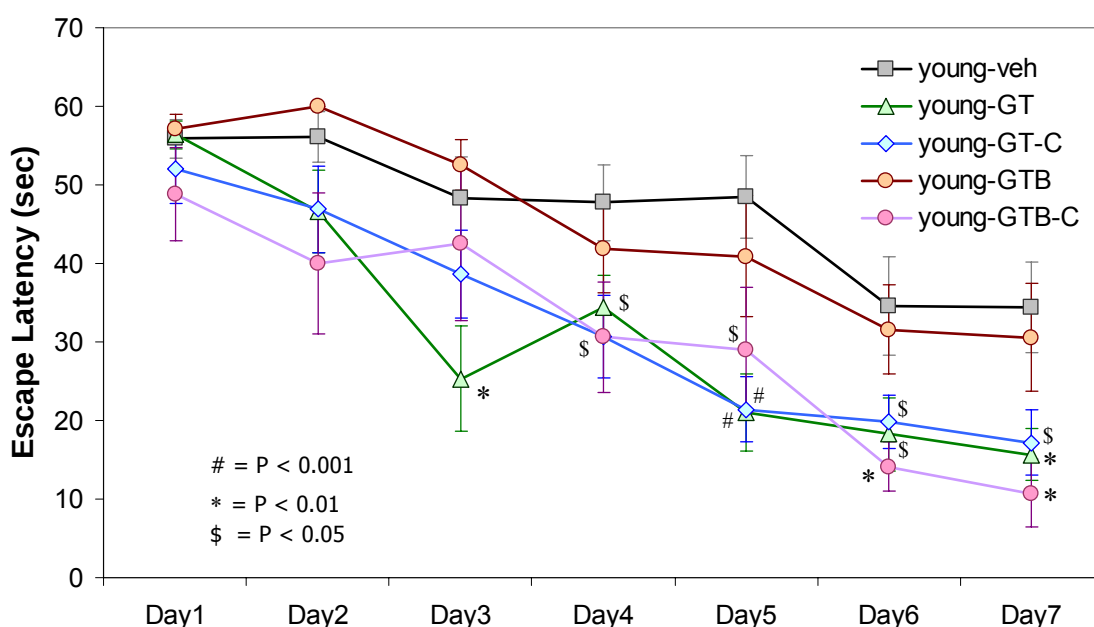
8.1 ผลต่อความจำเกี่ยวกับสถานที่

จากผลการทดลองพบว่า ในช่วงเวลา 1 สัปดาห์ของการฝึกด้วย MWM หนูแก่ตามธรรมชาติกลุ่มควบคุมใช้เวลาในการว่ายน้ำหาแท่นได้น้ำค่อนข้างนานกว่าหนูแก่กลุ่มที่ได้รับสารสกัดกากชาเขียว (GTB) และกากชาเขียวที่ถูกดองคาเฟอีนออก (GTB-C) ขนาด 300 มก./กก. น้ำหนักตัวเป็นเวลา 1 เดือนติดต่อกัน ดังแสดงในรูปที่ 42 โดยกลุ่มควบคุมมีค่าเฉลี่ยของ escape latency อยู่ในช่วง 47.0-60.0 วินาที แสดงให้เห็นว่าหนูกลุ่มนี้ความสามารถในการเรียนรู้และความจำที่ดีน้อยกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับ profile ของการเรียนรู้ในหนูแก่กลุ่ม GTB 300 และ GTB-C 300 ซึ่งมีค่าเฉลี่ยของ escape latency ที่สั้นกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$; Student's unpaired t- test) โดยเฉพาะในวันที่ 5-7 ของการฝึกด้วย MWM



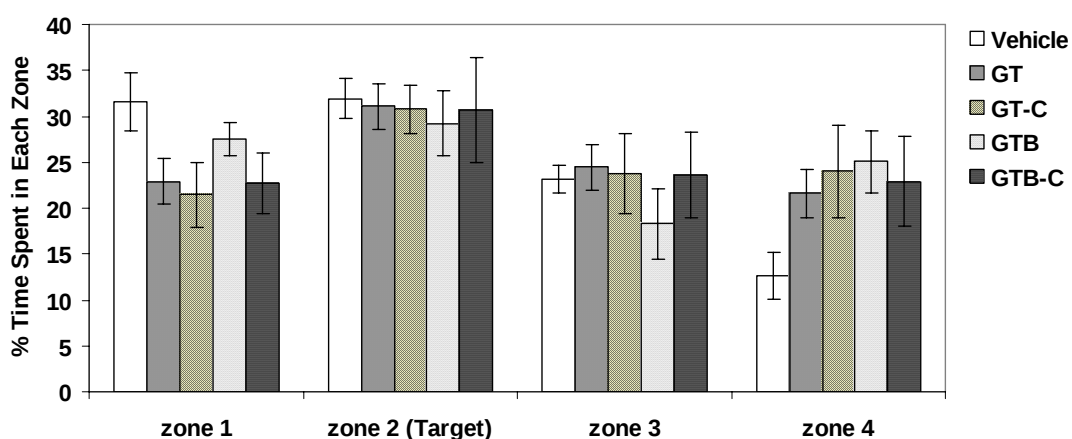
รูปที่ 42 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยเวลาหาแท่นได้น้ำของหนูแก่ตามธรรมชาติในการทดสอบด้วย Morris Water Maze ช่วงระยะเวลา 7 วัน โดยเปรียบเทียบระหว่างหนูแก่ที่ได้รับน้ำกลั่น (old vehicle; $n = 7$) หนูกลุ่มที่ได้รับกากชาเขียวปกติขนาด 300 มก/กก (old GTB; $n = 4$) กับหนูกลุ่มที่ได้รับกากชาเขียวที่ถูกดองคาเฟอีนออกขนาด 300 มก/กก (old GTB-C; $n = 9$) (# = $P < 0.001$, * = $P < 0.01$, \$ = $P < 0.05$ สถิติที่ใช้คือ Student's unpaired t- test)

สำหรับผลของกลุ่มหนูหนุ่มที่ได้รับการฉีด amyloid β peptides เข้าในสมองและนำมาฝึกด้วย MWM แสดงในรูปที่ 43 ซึ่งพบว่า กลุ่มควบคุม (young-veh) และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดกากชา (young-GTB) มีการสูญเสียความสามารถในการจดจำตำแหน่งของแท่นได้น้ำอย่างเห็นได้ชัดเจน: ตรงกันข้ามกับหนู 2 กลุ่มที่ได้รับสารสกัดชาเขียวที่มี (young-GT) และไม่มีคาเฟอีน (young-GT-C) และหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดกากชาที่ไม่มีคาเฟอีน (young-GTB-C) ซึ่งถ้าเปรียบเทียบเฉพาะหนูกลุ่ม young-GTB กับกลุ่ม young-GTB-C จะพบว่าการเรียนรู้ของหนูกลุ่ม young-GTB-C ดีกว่ากลุ่ม young-GTB อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$; Student's unpaired t- test) และเมื่อทดสอบความจำด้วยวิธี probe trial (ดังรูปที่ 44) พบว่ากลุ่มควบคุม (vehicle) มีค่าเฉลี่ยของระยะเวลาว่ายอยู่ในโซน 1 และโซน 2 (target) ค่อนข้างมากคือเท่ากับ 31.6 ± 3.2 และ 31.9 ± 2.2 ตามลำดับ ในขณะที่หนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดชาเขียวหรือกากชาเขียวทั้งที่มีและไม่มีคาเฟอีนใช้เวลาในการว่ายโดยเฉลี่ยอยู่ในบริเวณโซนที่ 2 ซึ่งจากกราฟรูปที่ 44 ชี้ให้เห็นว่าหนูที่ได้รับสารสกัดทั้งสี่กลุ่มยังจำได้ว่าบริเวณโซนที่ 2 เคยมีแท่นได้น้ำอยู่ และใช้เวลาเฉลี่ยในโซนที่สองเท่ากับ 31.1 ± 2.4 (GT +AB), 30.8 ± 2.6 (GT-C +AB), 29.2 ± 3.6 (GTB +AB) และ 30.7 ± 5.7 (GTB-C +AB) อย่างไรก็ตาม เมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติก็ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างเวลาเฉลี่ยที่หนูว่ายในโซนที่ 2 เปรียบเทียบกับโซนอื่นๆ



รูปที่ 43 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยเวลาหาแท่นได้น้ำของหนูถีบจักรหนุ่มที่ถูกทำให้เกิดภาวะความจำบกพร่องโดยการฉีด amyloid β_{25-35} peptides เข้าในโพรงสมอง และทดสอบด้วย Morris Water Maze ช่วงระยะเวลา 7 วัน ระหว่างหนูที่ได้รับน้ำกลั่น (young-veh; $n = 7$) กับหนูกลุ่มที่ได้รับชาเขียวปกติขนาด 300 มก/กก (young-GT; $n = 9$) หนูกลุ่มที่ได้รับชาเขียวที่ถูกดึงคาเฟอีนออก

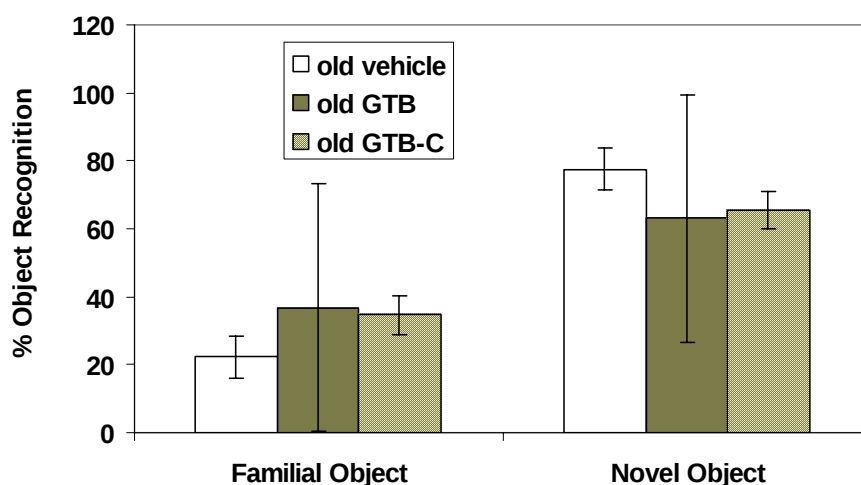
ขนาด 300 มก/กก (young-GT-C; n = 7) หนูกลุ่มที่ได้รับกากชาเขียวปกติขนาด 300 มก/กก (young-GTB; n = 7) และหนูกลุ่มที่ได้รับกากชาเขียวที่ถูกดัดแปลงคาเฟอีนออกขนาด 300 มก/กก (young-GTB-C; n = 6) (# = $P < 0.001$, * = $P < 0.01$, \$ = $P < 0.05$ สถิติที่ใช้คือ Student's paired t- test)



รูปที่ 44 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยระยะเวลาที่หนูหนู (ซึ่งถูกฉีดด้วย A β peptidess เข้าที่โพรงสมอง) ว่ายในโซนที่เคยมีแท่นได้น้ำ (Zone 2 : Target) เปรียบเทียบกับอีก 3 โซน ในการทดสอบชนิด probe trial ด้วย Morris Water Maze ในวันที่ 8 ซึ่งทั้งหนูแก่ที่ได้รับน้ำกลั่น (vehicle; n = 7) หนูกลุ่มที่ได้รับชาเขียวปกติขนาด 300 มก/กก (GT; n = 9) หนูกลุ่มที่ได้รับชาเขียวที่ถูกดัดแปลงคาเฟอีนออกขนาด 300 มก/กก (GT-C; n = 7) หนูกลุ่มที่ได้รับกากชาเขียวปกติขนาด 300 มก/กก (GTB; n = 4) กับหนูกลุ่มที่ได้รับกากชาเขียวที่ถูกดัดแปลงคาเฟอีนออกขนาด 300 มก/กก (GTB-C; n = 9)

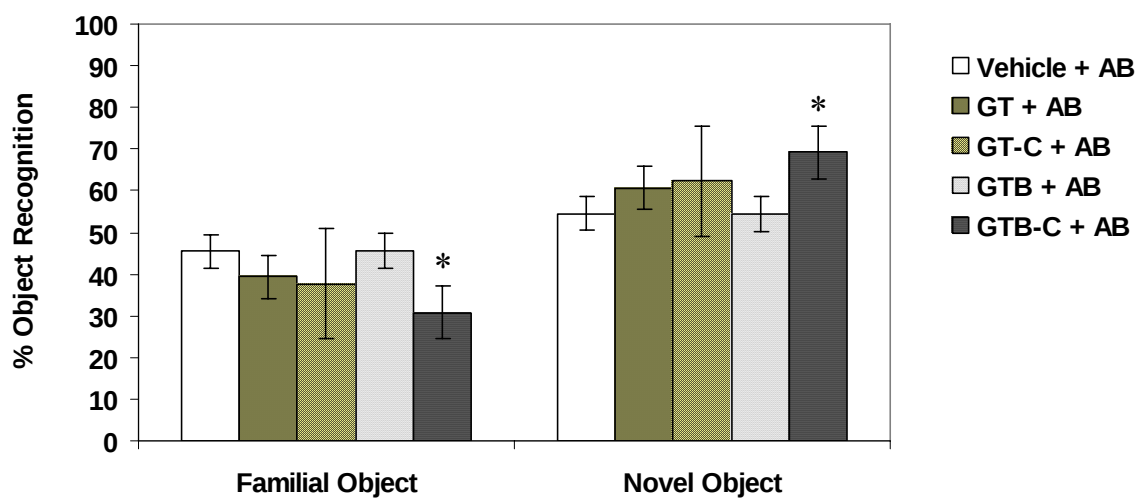
8.2 ผลการทดสอบด้วย Novel Object Recognition

ผลต่อการจดจำวัตถุที่เคยเห็นมาก่อนในหนูแก่กลุ่มควบคุม (vehicle) เปรียบเทียบกับกลุ่ม GTB และ GTB-C แสดงในรูปที่ 45 ซึ่งพบว่าหนูกลุ่มควบคุมมีค่าเฉลี่ยการจดจำวัตถุที่เคยเห็นมาก่อน (familial object) กับวัตถุอันใหม่ (novel object) เท่ากับ $22.4 \pm 6.2\%$ กับ $77.6 \pm 6.2\%$ ตามลำดับ ซึ่งพบว่ามีความสามารถในการจดจำที่ดีไม่แตกต่างกลุ่ม GTB และ GTB-C ซึ่งมีค่าเฉลี่ยการจดจำวัตถุที่เคยเห็นมาก่อนและวัตถุอันใหม่เท่ากับ $36.8 \pm 36.4\%$ กับ $63.2 \pm 36.4\%$ และ $34.6 \pm 5.6\%$ กับ $65.4 \pm 5.6\%$ ตามลำดับ



รูปที่ 45 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ ที่หนูแต่ละตามธรรมชาติสามารถจดจำได้ว่าวัตถุชิ้นใดเคยเห็นมาก่อน (familial object) และวัตถุใดเป็นอันใหม่ (novel object)

สำหรับผลต่อการจดจำวัตถุที่เคยเห็นมาก่อน ในหนูกลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่องด้วยการฉีด A β peptides ในโพรงสมองแสดงในรูปที่ 46 ซึ่งพบว่า กลุ่มควบคุม (vehicle + AB) มีค่าเฉลี่ยการจดจำวัตถุที่เคยเห็นมาก่อนกับวัตถุอันใหม่เท่ากับ $34.3 \pm 4.9\%$ กับ $65.7 \pm 4.9\%$ กลุ่มที่ได้รับสารสกัดชาเขียวที่มีคาเฟอีน (GT+AB) มีค่าเท่ากับ $39.3 \pm 5.3\%$ กับ $60.7 \pm 5.3\%$ กลุ่มที่ได้รับสารสกัดชาเขียวไม่มีคาเฟอีน (GT-C+AB) มีค่าเท่ากับ $37.7 \pm 13.1\%$ กับ $62.3 \pm 13.1\%$ กลุ่มที่ได้รับสารสกัดกากชาที่มีคาเฟอีน (GTB+AB) มีค่าเท่ากับ $45.6 \pm 4.4\%$ กับ $54.4 \pm 4.4\%$ และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดกากชาที่ไม่มีคาเฟอีน (GTB-C+AB) มีค่าเท่ากับ $32.3 \pm 5.5\%$ กับ $67.7 \pm 5.5\%$ ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมพบว่ามีความสามารถในการจดจำที่ใกล้เคียงกัน แต่มีหนูกลุ่ม GTB-C+AB เพียงกลุ่มเดียวที่มีความสามารถในการจดจำวัตถุเก่าและใหม่ได้ดีกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$; Student's unpaired t- test)



รูปที่ 46 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ที่หนูหนุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่องโดยการฉีด amyloid β_{25-35} peptides เข้าในโพรงสมอง (+ AB) สามารถจดจำได้ว่าวัตถุชิ้นใดเคยเห็นมาก่อน (familial object) และวัตถุใดเป็นอันใหม่ (novel object) (* = $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่ม vehicle + AB สถิติที่ใช้คือ Student's unpaired t- test)

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

1. ผลของสารสกัดชาเขียวและกากชาเขียวต่อพฤติกรรมการเคลื่อนไหว

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ชาเขียวขนาด 300 มก./กก. น้ำหนักตัว มีฤทธิ์กระตุ้นระบบประสาทส่วนกลางที่ส่งผลต่อการแสดงออกของพฤติกรรมการเคลื่อนไหว อาจเป็นผลเนื่องมาจากในชาเขียวมีสาร caffeine เป็นส่วนประกอบ (Weinreb, Mandel and Amit , 2004) และมีรายงานการศึกษาถึงผลของชาเขียวต่อระบบประสาทส่วนกลางที่ส่งผลต่อการแสดงออกของพฤติกรรมการเคลื่อนไหวพบว่า หนูทดลองที่ได้รับชาเขียวซึ่งมีสาร caffeine เป็นส่วนประกอบมีพฤติกรรมการเคลื่อนไหวเพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับหนูทดลองที่ได้รับเฉพาะสาร caffeine ในขนาดที่เท่ากับสาร caffeine ในชาเขียว (Laura, et al., 2003) จากผลการวิจัยชิ้นนี้พบว่ากากชาเขียวขนาด 300 มก./กก. น้ำหนักตัว มีฤทธิ์กระตุ้นระบบประสาทส่วนกลางที่ส่งผลต่อการแสดงออกของพฤติกรรมการเคลื่อนไหว ซึ่งอาจเป็นผลมาจากในกากชาเขียวมีสาร caffeine เป็นส่วนประกอบ เช่นเดียวกับในชาเขียวจึงส่งผลให้กระตุ้นพฤติกรรมการเคลื่อนไหวได้เช่นเดียวกับชาเขียว ส่วนชาเขียวและกากชาเขียวขนาด 30 และ 3 มก./กก. น้ำหนักตัว ไม่มีผลกระตุ้นระบบประสาทส่วนกลางที่ส่งผลต่อการแสดงออกของพฤติกรรมการเคลื่อนไหว เนื่องจากสาร caffeine ที่เป็นส่วนประกอบในชาเขียวและกากชาเขียว อาจไม่เพียงพอต่อการกระตุ้นการเคลื่อนไหว

2. ผลของสารสกัดชาเขียวและกากชาเขียวต่อความสามารถในการเรียนรู้และความจำ

จากการศึกษาผลของสารสกัดชาเขียวและกากชาเขียวเมื่อให้เป็นระยะเวลา 90 วัน ต่อการเรียนรู้และความจำเกี่ยวกับสถานที่ (spatial learning and memory) ในหนูปกติและหนูที่ชักนำให้เกิดความจำบกพร่องโดยการฉีด amyloid β protein ไปที่สมองส่วน hippocampus ซึ่งเป็นสมองส่วนที่พบว่า หากมีการเสื่อมสภาพของเซลล์ประสาท (Neurodegenerative) ของสมองส่วนนี้จะมีบทบาทสำคัญทำให้เกิดความผิดปกติของความจำที่พบในผู้ป่วยอัลไซเมอร์ระยะแรก (DeToledo-Morrell et al., 2004; Stoub et al., 2006) ผลที่ได้เบื้องต้นนี้พบว่าสารสกัดชาเขียวและกากชาเขียวมีผลช่วยป้องกันหรือฟื้นฟูความสามารถในการเรียนรู้และความจำในหนูที่ถูกชักนำให้เกิดความจำบกพร่อง เมื่อเปรียบเทียบกับหนูทดลองกลุ่มควบคุมจากการทดสอบความสามารถในการเรียนรู้และความจำเกี่ยวกับสถานที่โดยใช้ Morris Water Maze Test โดยสารสกัดที่พบในชาเขียวและกากชาเขียวซึ่งเป็นที่ทราบดีว่ามีความสามารถในการต่อต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant capacity) นั้นอาจมีบทบาทสำคัญ มีงานวิจัยที่สนับสนุนสมมติฐานนี้อาทิเช่นการศึกษาของ Coimbra et al.

ในปี 2005 ที่ทำการศึกษาค้นคว้าของการดื่มชาเขียวเป็นประจำ พบว่ามีผลทำให้มีการลดลงของ malonyldialdehyde (MDA) และ malonyldialdehyde+4-hydroxy-2(E)-nonenol (MDA*4-HNE) ในเลือด ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการ lipid peroxidation และสามารถกำจัดอนุมูลอิสระ (radical scavenging) และมีอีกการศึกษาพบว่า polyphenol ในชาเขียวสามารถเสริมฤทธิ์การทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระคือ glutathione peroxidase, catalase และ quinine reductase ในลำไส้เล็ก (small intestine), ตับ (liver). และปอด (lung) (Khan et al., 1992) นอกจากนี้ยังมีการทดลองถึงผลของสาร polyphenol ในชาเขียวต่อการเรียนรู้และความจำ พบว่าหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับสาร polyphenol 0.1% และ 0.5% ที่ให้ติดต่อกันเป็นเวลา 26 สัปดาห์ พบว่ามีการเรียนรู้และความจำด้านสถานที่ (spatial cognition learning memory) ดีกว่าหนูกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (Haque et al., 2006) แสดงว่าสารสกัดที่ได้จากใบชาเขียวมีผลในการต่อต้านอนุมูลอิสระและมีผลในการเรียนรู้และความจำ

สำหรับผลเบื้องต้นของสารสกัดจากกากชาเขียว พบว่ามีผลในการป้องกันภาวะความจำบกพร่องได้ในระดับที่ใกล้เคียงกับการให้ชาเขียว เมื่อป้อนในหนูทดลองด้วยปริมาณที่เท่ากัน ติดต่อกันทุกวันเป็นระยะเวลา 3 เดือน โดยจากการศึกษาเบื้องต้นของโครงการเพื่อการศึกษาวิจัยคุณสมบัติของกากชาเขียวที่นำทีมโดย ศ.ดร.นันทวัน บุญยะประสงค์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล พบว่า สารสกัดจากกากชาเขียวมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระค่อนข้างสูงมากพอๆ กับสารสกัดจากชาเขียว (unpublished data) ซึ่งสอดคล้องกับผลของงานวิจัยชิ้นนี้ที่พบว่า สารสกัดจากกากชาเขียวมีผลช่วยป้องกันหรือฟื้นฟูความสามารถในการเรียนรู้และความจำในหนูที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่องที่มีลักษณะคล้ายกับผู้ป่วยอัลไซเมอร์ในระยะแรก

จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า catechins ที่พบในชาเขียวมีผลป้องกันโรคทางระบบประสาทที่เกิดจากภาวะความเสื่อมจากอายุที่เพิ่มมากขึ้น มีความเกี่ยวข้องกับ reactive oxygen species (ROS) (Komatsu M and Hiramatsu M., 2000) โดยการเพิ่มขึ้นของ ROS ซึ่งเกิดจากอนุมูลอิสระใน membrane lipids เป็นเหตุให้มีการเสื่อมของ enzyme ในเซลล์เป็นบริเวณกว้างทำให้เกิดกระบวนการเสื่อมของระบบประสาท (neurodegenerative process) ตามมา (Yatin et al., 1999) การบริโภค catechins ที่พบในชาเขียวหรือกากชาเขียวอย่างต่อเนื่องมีผลกระตุ้น antioxidative enzyme (Khan et al., 1992) จากคุณสมบัติที่เป็น antioxidant ดังกล่าว อาจมีผลป้องกันการเกิด oxidative damage ในสมอง ดังนั้นสารสกัดจากกากชาเขียวและชาเขียวจึงมีผลช่วยป้องกันหรือฟื้นฟูความสามารถในการเรียนรู้และความจำ ในหนูที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่องที่มีลักษณะคล้ายกับผู้ป่วยอัลไซเมอร์ในระยะแรกเมื่อเปรียบเทียบกับหนูทดลองกลุ่มควบคุมจากการ

ทดสอบความสามารถในการเรียนรู้และความจำเกี่ยวกับสถานที่โดยใช้ Morris Water Maze Test ส่วนผลการวิจัยในเรื่องเปอร์เซ็นต์เวลาที่หนูทดลองอยู่ใน zone ที่เคยมีแท่นได้น้ำมาก่อน (Probe Trial) ซึ่งถูกทดสอบในวันที่ 11 ภายหลังการผ่าตัดชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่องนั้น ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่ม ซึ่งอาจเกิดจากผลของการเรียนรู้ซ้ำจากการทดสอบระยะเวลาในการหาแท่นได้น้ำ (Escape latency) ซึ่งได้ทำการทดสอบก่อนการทดสอบ Probe trial จึงอาจส่งผลให้หนูทดลองในทุกกลุ่มมีการเรียนรู้ใหม่ จึงเป็นเหตุให้ผลการทดลองในส่วนของ Probe trial ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่ม จากข้อมูลข้างต้นได้บ่งบอกถึงระยะเวลาที่ให้ผลเกิดภาวะความจำบกพร่องจากการผ่าตัดฉีดสาร amyloid β peptides ไปที่สมองส่วน hippocampus ทั้งสองข้างว่าจะเกิดผลดังกล่าวเมื่อทำการทดสอบโดย Morris Water Maze ในช่วงวันที่ 10 ภายหลังการผ่าตัด และจะเกิดผลให้เกิดภาวะความจำบกพร่องในส่วน of reference memory ที่ทำการทดสอบโดย radial arm maze ในช่วงวันที่ 20 ภายหลังการผ่าตัด

สำหรับผลในเรื่องของ working memory และ reference memory ที่ทดสอบโดย Radial Arm Maze ชี้ให้เห็นว่า การให้สารกากชาเขียวและชาเขียวในปริมาณดังกล่าว (300 มก/กก น้ำหนักตัว) เป็นเวลา 3 เดือนติดต่อกันทุกวัน ไม่มีผลในการช่วยป้องกันหรือฟื้นฟูความสามารถในการเรียนรู้และความจำในหนูที่ถูกชักนำให้เกิดความจำบกพร่องอย่างมีนัยสำคัญ โดยผลดังกล่าวอาจเกิดจากการที่มีจำนวนสัตว์ทดลองที่ใช้ในแต่ละกลุ่มยังน้อยเกินไปสำหรับการทดสอบทางสถิติ และมีจำนวนที่ไม่เท่ากันในแต่ละกลุ่ม ซึ่งเกิดจากการที่มีสัตว์ทดลองเสียชีวิตจากผลข้างเคียงของยาสลับระหว่างการผ่าตัดและความจำกัดของระยะเวลาในการวิจัยที่ต้องรายงานผล 6 เดือนแรก จึงอาจมีผลให้ผลการวิจัยไม่มีความแตกต่างในเรื่องของ working memory และ reference memory อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับหนูทดลองกลุ่มควบคุม

ดังนั้นจึงสรุปเบื้องต้นได้ว่า การบริโภคกากชาเขียวติดต่อกันเป็นเวลา 90 วัน มีผลในการช่วยป้องกันหรือฟื้นฟูความสามารถในการเรียนรู้และความจำในภาวะความจำบกพร่องที่มีลักษณะคล้ายกับผู้ป่วยอัลไซเมอร์ในระยะแรกได้เช่นเดียวกันกับการบริโภคชาเขียวอย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลาและในปริมาณที่เท่ากัน

3. ผลของสารสกัดชาเขียวและกากชาเขียวในการป้องกันภาวะความจำบกพร่องจาก

$A\beta_{25-35}$ peptides

งานวิจัยส่วนนี้เป็นการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดชาเขียวและกากชาเขียวในการป้องกันการเกิดภาวะความจำบกพร่อง จากผลของโดยฉีด $A\beta_{25-35}$ peptides เข้าที่โพรงสมอง หรือ cerebral ventricle ของหนูทดลองทุกกลุ่ม ซึ่งจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า หนูที่ถูกฉีด $A\beta_{25-35}$

peptides และได้รับน้ำกลั่น (กลุ่ม Control-A β) เกิดความบกพร่องของการเรียนรู้และความจำระยะยาวและระยะสั้นที่เกี่ยวกับสถานที่เมื่อทดสอบด้วยวิธี MWM และ RAM ตามด้วยการทดสอบการจดจำวัตถุสิ่งของด้วยวิธี NOR ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับรายงานวิจัยที่ผ่านมา ที่ระบุว่า การฉีด A β_{25-35} เข้าที่โพรงสมองของหนูแรท สามารถชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่องของการเรียนรู้และความจำที่เกี่ยวกับสถานที่เมื่อทดสอบด้วยวิธี MWM (Delobette, et al., 1997) และวิธี RAM (Stepanichev et al., 2004; Stepanichev et al., 2005; Stepanichev et al., 2006) ความจำเกี่ยวกับวัตถุสิ่งของเมื่อทดสอบด้วยวิธี NOR (Tsunekawa et al., 2008) และความจำทางสังคม (Stepanichev et al., 2003; Klementiev, et al., 2007) ซึ่งอธิบายได้ว่าเกิดจาก A β_{25-35} กระตุ้นให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทโดยตรง (Yamada and Nabeshima, 2000) หรือเป็นผลจากการกระตุ้นให้เกิดภาวะ oxidative stress ในเซลล์ประสาทที่บริเวณสมองส่วน hippocampus ซึ่งมีความสำคัญต่อการเรียนรู้และความจำ โดยเกิดภาวะ lipid peroxidation ทำให้มีการสร้างอนุมูลอิสระ เช่น o^{2-} (Stepanichev et al., 2004) และทำให้เซลล์ประสาทตายในที่สุด นอกจากนี้ จากการศึกษาทางเซลล์วิทยาพบว่า A β_{25-35} สามารถทำให้เกิด degeneration ของ synapse ที่บริเวณสมองส่วน parietal cortex ส่วน dentate gyrus และส่วน CA1 กับ CA3 ของ hippocampus (Tohda, Tamura and Komatsu, 2003) ซึ่งภาวะดังกล่าวเกิดเช่นเดียวกันกับพยาธิสภาพของผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์

ส่วนการทดสอบด้วยวิธี MWM และเอาแท่นได้น้ำออก หรือเรียกว่าวิธี probe trial ที่พบว่าหนูทดลองกลุ่ม Control-A β ไม่พบความแตกต่างของเปอร์เซ็นต์ของระยะเวลาในการว่ายน้ำอยู่ใน zone ที่เคยมีแท่นเมื่อเปรียบเทียบกับหนูทดลองกลุ่ม Control-sham ผลที่ได้คล้ายกับการทดลองของ Sipos และคณะ ในปี 2007 ที่ทำการฉีด A β_{25-35} peptides เข้าไปยังสมองส่วน entorhinal cortex เพื่อชักนำให้เกิดความจำบกพร่อง และทำการทดสอบพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำโดยใช้วิธี probe trial ในวันถัดจากการทดสอบระยะเวลาในการหาแท่นได้น้ำ ซึ่งพบว่าหนูทดลองกลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดความจำบกพร่อง มีเปอร์เซ็นต์ของระยะเวลาในการว่ายน้ำอยู่ใน zone ที่เคยมีแท่นมากกว่า zone อื่นๆ และไม่แตกต่างกับหนูทดลองกลุ่มที่ไม่ถูกฉีด A β_{25-35} เข้าไปยังสมองส่วน entorhinal cortex Sipos และคณะ ได้อธิบายว่าอาจเกิดจากผลของการเรียนรู้ซ้ำจากการทดสอบระยะเวลาในการหาแท่นได้น้ำ จึงอาจส่งผลให้หนูทดลองในทุกกลุ่มมีการเรียนรู้ใหม่ จึงเป็นเหตุให้ผลการทดลองในส่วนของการ probe trial ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่ม

สำหรับการทดสอบพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำด้วยวิธี RAM ในสัปดาห์ที่ 1 สัปดาห์ที่ 2 และสัปดาห์ที่ 4 ของการทดสอบ ที่พบว่าหนูทดลองกลุ่ม Control-A β มีความสามารถในการจดจำอ้างอิงไม่ต่างจากหนูทดลองกลุ่ม Control-Sham อาจเนื่องมาจากในช่วงสัปดาห์ที่ 1 สัปดาห์ที่ 2 เป็นช่วงเริ่มต้นของการเรียนรู้และจดจำตำแหน่งของอาหารในอุปกรณ์ RAM และในสัปดาห์ที่ 3 อาจเป็นช่วงที่หนูทดลองกลุ่ม Control-Sham สามารถจดจำตำแหน่งอ้างอิงของอาหารได้ จึงทำให้มีค่าความผิดพลาดในการจดจำอ้างอิง หรือ RME ลดลงในขณะที่หนูทดลองกลุ่ม Control-A β เกิดภาวะความจำบกพร่อง จึงทำให้จดจำตำแหน่งของอาหารในอุปกรณ์ RAM ได้ไม่แม่นยำเท่าหนูทดลองกลุ่ม Control-Sham ส่วนในสัปดาห์ที่ 4 ของการทดสอบ ที่พบว่าหนูทดลองกลุ่ม Control-A β มีความสามารถในการจดจำอ้างอิงไม่ต่างจากหนูทดลองกลุ่ม Control-Sham เนื่องจากระยะเวลาทั้งหมดของการทดสอบ RAM อาจไม่มากเพียงพอที่จะเห็นความแตกต่างอย่างชัดเจนของความสามารถในการจดจำอ้างอิง ระหว่างหนูปกติและหนูที่เกิดภาวะความจำบกพร่อง ซึ่งรูปแบบจากผลของการทดสอบด้วยวิธี RAM นี้คล้ายคลึงกับผลของ Stepanichev และคณะ (2006) ที่ทำการศึกษาโดยการผ่าตัดเพื่อฉีด A β ₂₅₋₃₅ เข้ายังบริเวณโพรงสมองของหนูทดลองและหลังจากผ่าตัด 1 เดือนจะทำการทดสอบพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำโดยใช้วิธี RAM ใช้ระยะเวลาในการทดสอบทั้งหมด 6 สัปดาห์ พบว่าหนูทดลองกลุ่มที่ถูกฉีดด้วย A β ₂₅₋₃₅ peptides มีค่า RME ไม่ต่างจากกลุ่ม sham ในช่วงสัปดาห์ที่ 1 3 และ 4 แต่มีค่า RME มากกว่ากลุ่ม sham ในช่วงสัปดาห์ที่ 2 สัปดาห์ที่ 5 และ สัปดาห์ที่ 6 ซึ่งการทดลองของ Stepanichev ใช้ระยะเวลาในการทดสอบทั้งหมด นานกว่าจึงทำให้เห็นความแตกต่างอย่างชัดเจนระหว่างหนูปกติและหนูที่เกิดภาวะความจำบกพร่อง ในช่วงสัปดาห์ที่ 5 และ 6 ของการทดสอบ

สำหรับความสามารถของความจำขณะทำงาน (working memory) ที่พบว่าหนูทดลองกลุ่ม Control- A β มีค่าความผิดพลาดของความจำขณะทำงาน หรือ WME ไม่แตกต่างกับหนูทดลองกลุ่ม Control-Sham อาจเนื่องมาจากระยะเวลาทั้งหมดของการทดสอบ RAM อาจไม่มากเพียงพอที่จะเห็นความแตกต่างอย่างชัดเจนในความสามารถของความจำขณะทำงานระหว่างหนูปกติและหนูที่เกิดภาวะความจำบกพร่อง ซึ่งคล้ายคลึงกับผลของ Stepanichev และคณะ (2006) ที่ไม่พบความแตกต่างของค่า WME ในช่วงสัปดาห์ที่ 1 ถึง 4 ของการทดสอบ แต่จะพบความแตกต่างของค่า WME ในกลุ่มที่ถูกฉีดด้วย A β ₂₅₋₃₅ peptides ที่มีค่ามากกว่ากลุ่ม sham อย่างมีนัยสำคัญในช่วงสัปดาห์ที่ 5 และ 6 ของการทดสอบ

จากรายงานการศึกษาที่ผ่านมา มีเพียงการศึกษาของ Haque และคณะ (2008) ที่ศึกษาผลของสาร catechin ในหนูทดลองที่มีความจำบกพร่องที่เกิดจากการชักนำของ $A\beta$ โดยฉีด $A\beta_{1-40}$ peptides เข้าทางโพรงสมอง และได้รับสาร catechin ผสมในน้ำดื่มที่ขนาด 0.5% ติดต่อกันเป็นเวลา 26 สัปดาห์ จากผลการทดลองพบว่าสาร catechin สามารถลดระดับการเกิด lipid peroxidation ในเลือด ระดับของ ROS ในสมองส่วน hippocampus และส่งเสริมและ/หรือฟื้นฟูทั้งความจำอ้างอิง และความจำขณะทำงานเมื่อทดสอบโดยใช้วิธี RAM ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยชิ้นนี้ที่พบว่า ชาเขียวและกากชาเขียวมีฤทธิ์ในการป้องกันการเกิดภาวะความจำบกพร่องที่เกิดจากการชักนำของ $A\beta_{25-35}$ peptides อาจเป็นผลเนื่องมาจากในชาเขียวมีสาร catechin ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระเป็นส่วนประกอบ โดยทั่วไปใบชาแห้งจะมีสาร catechin ประมาณ 30 % หรือ ในน้ำชาเขียว 1 ถ้วย มีปริมาณสาร catechin ประมาณ 100 -150 มิลลิกรัม เนื่องจากปริมาณสารกากชาเขียวที่ให้แก่สัตว์ทดลองแล้วเห็นผลดีต่อภาวะความจำบกพร่องคือ 300 มิลลิกรัม/กก น้ำหนักตัว และกากชาเขียวที่ใช้ในการทดลองนี้มีปริมาณสาร catechin ประมาณ 23.51 % (w/w) หากเทียบกลับจะคิดเป็นปริมาณสาร catechin ที่ให้ 70.53 มิลลิกรัม/กก น้ำหนักตัว ซึ่งเป็นปริมาณที่ค่อนข้างสูง ดังนั้นสาร catechin ในกากชาเขียว อาจมีส่วนช่วยในการป้องกันการเกิดภาวะความจำบกพร่องได้เช่นเดียวกับการให้ชาเขียว หรือการให้สาร catechin ได้

4. ผลของสารสกัดชาเขียวและกากชาเขียวต่อการทำงานของเอนไซม์ SOD และ GPx

มีรายงานการศึกษาที่สนับสนุนสมมติฐานที่เชื่อว่า โรคอัลไซเมอร์เกี่ยวข้องกับภาวะ oxidative stress เนื่องจากมีรายงานที่พบว่าเกิดภาวะ lipid peroxidation เพิ่มขึ้นในสมองของผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์หลังจากเสียชีวิต (Mizuno and Ohta, 1986 ; Richardson, 1993 ; Marcus, et al., 1998) แต่อย่างไรก็ตามรายงานที่ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างค่าระดับการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระกับโรคอัลไซเมอร์ยังคงให้ผลที่ขัดแย้งกัน โดยมีรายงานว่าสมองของผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์หลังจากเสียชีวิต มีการเพิ่มขึ้นของค่าระดับการทำงานของเอนไซม์ SOD ในสมองส่วน temporal lobe (Mizuno and Ohta, 1986) เอนไซม์ GPx ในสมองส่วน hippocampus และเอนไซม์ CAT ในสมองส่วน hippocampus ส่วน superior และ middle temporal gyri (Lovell, et al., 1995) บางการศึกษารายงานว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของค่าระดับการทำงานของเอนไซม์ SOD (Marcus, et al., 1998) เอนไซม์ GPx และเอนไซม์ CAT ในทุกส่วนของสมอง (Kish, Morito and Hornykiewicz, 1986; Richardson, 1993; Chen, et al., 1994) และมีบางการศึกษา รายงานว่ามีการลดลงของค่าระดับการทำงานของเอนไซม์ SOD ในสมองส่วน hippocampus และ

ส่วน frontal lobe (Richardson, 1993) และเอนไซม์ CAT ในสมองส่วน temporal lobe (Marcus, et al., 1998)

สำหรับในงานวิจัยชิ้นนี้เป็นการศึกษาในสัตว์ทดลองที่ถูกฉีด $A\beta_{25-35}$ peptides เข้ายังบริเวณโพรงสมองเพื่อชักนำให้เกิดความจำบกพร่อง ซึ่งเป็นการจำลองภาวะการเกิดโรคอัลไซเมอร์ในมนุษย์ และวัดค่าระดับการทำงานของเอนไซม์ SOD และ GPx ในสมองส่วน hippocampus จากผลการทดลองพบว่า หนูทดลองกลุ่มที่ได้รับน้ำกลั่น และถูกผ่าตัดเพื่อฉีด $A\beta_{25-35}$ peptides เข้าไปยังบริเวณโพรงสมอง (กลุ่ม Control- $A\beta$) มีค่าระดับการทำงานของเอนไซม์ SOD และ GPx ในสมองส่วน hippocampus น้อยกว่าหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับน้ำกลั่น และถูกผ่าตัดเพื่อฉีดน้ำเกลือเข้ายังบริเวณโพรงสมอง (กลุ่ม Control-sham) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Kim และคณะ (2003) ที่ทำการศึกษาโดยฉีด $A\beta_{1-42}$ peptides เข้าไปยังบริเวณโพรงสมองของหนูขาว และศึกษาโดยใช้วิธี immunohistochemistry จากผลการศึกษาพบว่า mitochondria ในสมองส่วน cortex ส่วน hippocampus และส่วน thalamus ของหนูทดลองกลุ่มที่ถูกฉีดด้วย $A\beta_{1-42}$ peptides เข้าไปยังบริเวณโพรงสมอง มีการแสดงออก (expression) ของโปรตีนของเอนไซม์ SOD และ GPx ลดลง และรายงานของ Um และคณะ (2006) ที่ทำการศึกษาโดยฉีด $A\beta_{25-35}$ peptides เข้าไปยังบริเวณโพรงสมองของหนูถีบจักรเพื่อจำลองภาวะการเกิดโรคอัลไซเมอร์ พบว่าในสมองส่วน hippocampus ของหนูทดลองกลุ่มถูกฉีดด้วย $A\beta_{25-35}$ peptides เข้าไปยังบริเวณโพรงสมอง เกิดภาวะ lipid peroxidation เพิ่มขึ้น และมีค่าระดับการทำงานของเอนไซม์ GPx ลดลง ส่วนเอนไซม์ SOD มีแนวโน้มลดลงแต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ จากการศึกษาที่กล่าวมาข้างต้นอธิบายว่า ทั้ง $A\beta_{25-35}$ และ $A\beta_{1-42}$ peptides กระตุ้นให้เกิดการเสื่อมสลาย (impairment) ต่อเอนไซม์ SOD และ GPx นอกจากการฉีด $A\beta$ เข้าไปยังบริเวณโพรงสมองยังมีรายงานของ Shen และคณะ (2002) ที่ศึกษาโดยฉีด $A\beta_{25-35}$ peptides เข้าไปยังสมองส่วน hippocampus จากผลการทดลองพบว่าหนูทดลองกลุ่มถูกฉีดด้วย $A\beta_{25-35}$ peptides มีค่าระดับการทำงานของเอนไซม์ SOD และ GPx ในสมองส่วน hippocampus ลดลง Shen และคณะอธิบายว่า $A\beta_{25-35}$ peptides อาจกระตุ้นให้เกิดความเป็นพิษ (toxicity) ต่อเอนไซม์ทั้งสองชนิดทำให้มีการทำงานลดลง นอกจากนี้มีรายงานที่ศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงของเซลล์ประสาทค้ำจุนชนิด astrocyte (Cheon, et al., 2005) เซลล์เพาะเลี้ยงของเซลล์ประสาทสมองส่วน hippocampus เมื่อถูกกระตุ้นด้วย $A\beta_{25-35}$ peptides จะส่งผลให้มีการทำงานของเอนไซม์ SOD และ GPx และการอยู่รอดของเซลล์ลดลง (Dong, et al., 2007)

มีรายงานการศึกษาถึงคุณสมบัติในการต่อต้านอนุมูลอิสระของชาเขียวและสารสำคัญในชาเขียวในมนุษย์พบว่า ชาเขียวสามารถลดระดับ MDA ใน plasma (เป็นสารที่ถูกสร้างจากกระบวนการ lipid peroxidation) เมื่อดื่มขนาด 3 กรัมต่อวันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ (Freese, et al., 1999) และสามารถเพิ่มความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระทั้งหมด (total antioxidant activity) ใน plasma เมื่อดื่มขนาด 320 มก. ต่อวันเป็นเวลา 6 สัปดาห์ (Erba, et al., 2005) การศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่าหนูทดลองที่ได้รับสาร catechin ขนาด 0.5 และ 0.1 % เป็นเวลา 26 สัปดาห์ มีระดับ ROS และ MDA ในสมองส่วน hippocampus น้อยกว่าหนูทดลองกลุ่มควบคุม (Haque, et al., 2006) สำหรับรายงานการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างผลของชาเขียวและสารสำคัญในชาเขียวกับการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระยังคงให้ผลที่ขัดแย้งกัน จากรายงานของ Komatsu และ Hiramatsu (2000) พบว่าหนูแก่ที่ได้รับสาร catechin เป็นเวลา 1 เดือน มีค่าระดับการทำงานของเอนไซม์ SOD เพิ่มขึ้นใน mitochondria fraction ของสมองส่วน striatum และ midbrains และรายงานของ Levites และคณะ (2001) พบว่าหนูถีบจักรที่ได้รับสาร EGCG มีค่าระดับการทำงานของเอนไซม์ SOD และ CAT เพิ่มขึ้นในสมองส่วน striatum ในขณะที่รายงานของ Skrzydlewska และคณะ (2002) พบว่าในสมองของหนูทดลองที่ดื่มชาเขียวขนาด 3 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 5 สัปดาห์ มีระดับ 4HNE และ MDA (เป็นสารที่ถูกสร้างจากกระบวนการ lipid peroxidation) มีค่าระดับการทำงานของเอนไซม์ SOD และ GPx ลดลง และมีค่าระดับการทำงานของเอนไซม์ CAT เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของชาเขียวในการป้องกันความบกพร่องด้านการเรียนรู้และความจำที่ถูกชักนำจาก $A\beta$ ต่อระดับการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ

ในงานวิจัยชิ้นนี้เป็นการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของชาเขียวและกากชาเขียวในการป้องกันความบกพร่องด้านการเรียนรู้และความจำที่ถูกชักนำจาก $A\beta_{25-35}$ peptides ต่อระดับการทำงานของเอนไซม์ SOD และ GPx ในสมองส่วน hippocampus จากผลการทดลองพบว่าหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับชาเขียวขนาด 300 และกากชาเขียวขนาด 30 และ 300 มก./กก. น้ำหนักตัว และถูกฉีด $A\beta_{25-35}$ peptides เข้าไปยังบริเวณโพรงสมองเพื่อชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่อง มีค่าระดับการทำงานของเอนไซม์ SOD และ GPx ในสมองส่วน hippocampus ใกล้เคียงกับหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับน้ำและถูกฉีดด้วยน้ำเกลือเข้าไปยังบริเวณโพรงสมอง จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าชาเขียวซึ่งมีสารสำคัญที่มีคุณสมบัติในการต่อต้านอนุมูลอิสระ อาจมีฤทธิ์ในการกำจัด

อนุมูลอิสระ และ/หรือมีฤทธิ์ในการเสริมการทำงาน และ/หรือเพิ่มปริมาณเอนไซม์ SOD และ GPx ในสมองส่วน hippocampus มีผลทำให้ป้องกันหรือลดการเกิดภาวะ lipid peroxidation ในสมองส่วน hippocampus ส่งผลให้ลดการเสื่อมสลายและการตายของเซลล์ประสาท จึงสามารถป้องกันหรือลดการเกิดภาวะความจำบกพร่องได้ ส่วนกากชาเขียวที่มีสารต้านอนุมูลอิสระในปริมาณที่ใกล้เคียงกับชาเขียว จึงมีคุณสมบัติต่อต้านอนุมูลอิสระและสามารถป้องกันหรือลดการเกิดภาวะความจำบกพร่องได้เช่นเดียวกับชาเขียว

สำหรับหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับสารสกัดชาเขียวขนาด 30 มก./กก ที่พบว่ามีความระดับการทำงานของเอนไซม์ SOD และ GPx ในสมองส่วน hippocampus น้อยกว่าหนูทดลองกลุ่ม Control-sham แต่ไม่แสดงพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำบกพร่อง อาจเนื่องมาจากชาเขียวขนาด 30 มก./กก อาจมีสารสำคัญที่มีคุณสมบัติในการต่อต้านอนุมูลอิสระ ในปริมาณที่ไม่มากเพียงพอในการเสริมฤทธิ์การทำงาน และ/หรือเพิ่มปริมาณเอนไซม์ SOD และ GPx ในสมองส่วน hippocampus แต่อาจเพียงพอต่อการกระตุ้นการป้องกันหรือลดการเกิดภาวะความจำบกพร่องโดยผ่านทางกลไกอื่น เช่น มีรายงานว่าสมองของผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์และสัตว์ทดลองที่ถูกฉีด A β เข้าไปในส่วนของสมองเพื่อชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่องพบว่า การทำงานของเอนไซม์ choline acetyltransferase (ChAT) และมีการสร้าง acetylcholine (ACh) ลดลง ซึ่งเชื่อว่า ACh เป็นสารสื่อประสาทที่เกี่ยวข้องกับการเรียนรู้และความจำ (Yamaguchi and Kawashima, 2001; Giovannelli, Casamentia and Scalia, 1995) และมีรายงานว่าชาเขียวสามารถป้องกันการเกิดภาวะความจำบกพร่องในหนูแก่ได้ ซึ่งผ่านทางระบบ Cholinergic โดยพบว่าชาเขียวมีผลไปลดการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase (AChE) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการทำลายเอนไซม์ ACh (Kaur, Pathak and Pandhi, 2008) และมีรายงานว่าเอนไซม์ AChE สามารถส่งเสริมให้เกิดการก่อตัวของ A β (Inestrosa, Alvarez and Pérez, 1996) ซึ่งก่อให้เกิดเป็น A β fibrils

จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่า A β ₂₅₋₃₅ peptides อาจมีผลกระตุ้นให้เกิดการเสื่อมสลายของเอนไซม์ SOD และ GPx และ/หรือกระตุ้นให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระในสมองส่วน hippocampus เพิ่มขึ้น จึงอาจทำให้รบกวนสมดุลระหว่างอนุมูลอิสระและเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในสมอง เป็นผลให้เกิดภาวะ oxidative stress และการตายของเซลล์ประสาท ที่เป็นสาเหตุของการเกิดความบกพร่องของการเรียนรู้และความจำ ชาเขียวและกากชาเขียวอาจมีผลในการกำจัด

อนุมูลอิสระ และ/หรือมีฤทธิ์ในการเสริมการทำงาน และ/หรือเพิ่มปริมาณเอนไซม์ SOD และ GPx จึงอาจช่วยลดการเกิดภาวะ oxidative stress และลดการตายต่อเซลล์ประสาทในสมองส่วน hippocampus เป็นผลให้ป้องกันการเกิดความบกพร่องของการเรียนรู้และความจำและเป็นที่น่าสนใจว่าสารสกัดจากชาเขียวมีประสิทธิภาพในการป้องกันการเกิดภาวะความจำบกพร่อง ได้ดีกว่าสารสกัดชาเขียวที่ขนาดเท่ากัน

5. ผลของชาเขียวและกากชาเขียวที่ไม่มีคาเฟอีนต่อการเรียนรู้และความจำ

จากบทความงานวิจัยเบื้องต้นของ University of South Florida Health ที่ตีพิมพ์ในวารสาร ScienceDaily เมื่อเดือนกรกฎาคม ค.ศ. 2009 ได้ระบุว่าผู้สูงอายุที่ดื่มกาแฟที่มีคาเฟอีน 5 แก้วต่อวัน หรือน้ำชา 14 แก้วต่อวัน อาจมีส่วนช่วยปกป้องภาวะความสมองเสื่อมจากโรคอัลไซเมอร์ได้ โดยอ้างถึงงานวิจัยของ Arendash และคณะ (2009) กับ Cao และคณะ (2009) ซึ่งได้ทำการทดลองในหนูถีบจักรที่ได้รับคาเฟอีนในขนาด 0.3 มก/มล ต่อวัน (เท่ากับที่คนบริโภคในขนาด 500 มก.) พบว่าคาเฟอีนนอกจากจะช่วยเสริมการเรียนรู้และความจำแล้ว ยังมีฤทธิ์ลดระดับของ amyloid- β peptides ในสมองของหนูแก่และหนูที่มียีนส์ที่กระตุ้นการสร้าง amyloid- β peptides ในสมองส่วน entorhinal cortex และ hippocampus ลงอย่างมีนัยสำคัญ โดยพวกเขาอธิบายว่าคาเฟอีนน่าจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α -secretase และ β -secretase ทำให้ลดการสร้าง amyloid- β peptides ในสมอง

อย่างไรก็ตาม จากรายงานวิจัยที่ผ่านมาอาจสรุปได้ว่าไม่เพียงแต่คาเฟอีนเท่านั้นที่มีส่วนช่วยเสริมและปกป้องการเรียนรู้และความจำ อาจมีสารตัวอื่นอีกในสารสกัดชาเขียวและกากชาเขียว เช่น สาร polyphenols (พวก catechins) ที่มีรายงานวิจัยพบว่ามีส่วนช่วยส่งเสริมการเรียนรู้และความจำในหนูทดลอง (Haque, et al., 2006; Kaur, et al., 2008; Unno, et al., 2007; Vignesa, et al., 2006) และช่วยปกป้องความเสื่อมของสมองโดยลดการเกิด amyloid plaques ในสมองส่วน cingulate cortex, hippocampus และ entorhinal cortex (Rezai-Zadeha, et al., 2008) ซึ่งจากผลการทดลองในงานวิจัยนี้ก็พบเช่นเดียวกันว่าหนูทดลองที่ได้รับสารสกัดชาเขียวหรือกากชาที่มีและไม่มีคาเฟอีน สามารถแสดงพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำในระดับที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

6. สรุปและข้อเสนอแนะ

ผลการทดลองจากงานวิจัยนี้อาจสรุปได้ว่า กากชาเขียวยังเป็นสิ่งที่มีความประโยชน์ สามารถนำมาสกัดเป็นอาหารเสริมบำรุงสุขภาพ เพราะในสารสกัดกากชาเขียวยังมีสารพวก polyphenols รวมทั้งคาเฟอีนที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งอาจช่วยปกป้องภาวะความจำบกพร่องจากการเสื่อมของสมองตามอายุขัย หรือจากความผิดปกติของการสร้าง amyloid- β peptides ในสมอง ข้อมูลผลการวิจัยที่ได้จากโครงการวิจัยนี้เป็นประโยชน์สำหรับงานวิจัยในเฟสต่อไป อาทิเช่น การศึกษาผลของสารสกัดกากชาเขียวต่อการเรียนรู้และความจำในคนปกติ เช่น นิสิต นักศึกษา ผู้ที่อยู่ในวัยทำงาน หรือผู้สูงอายุ เป็นต้น ซึ่งข้อมูลการวิจัยเหล่านี้จะเป็นประโยชน์สำหรับการพัฒนา

สารสกัดกากชาเขียวให้เป็นอาหารเสริมบำรุงสุขภาพ เป็นการเพิ่มมูลค่าของใบชา และช่วยลด
มลภาวะจากการทิ้งหรือทำลายกากชา

บรรณานุกรม

1. สมพร ภูதியานันต์ (พ.ศ. 2546). ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับการแพทย์แผนไทย ว่าด้วยสมุนไพรกับการแพทย์แผนไทย. เชียงใหม่: โรงพิมพ์ดุสิตการพิมพ์.
2. สุวิทย์ เดชรูวานันท์. (25 กันยายน 2549). คนไทยเป็นโรคอัลไซเมอร์ 6 แสนเสียชีวิตทางเศรษฐกิจหวั่นละ 8 แสน. [ไม่ทราบชื่อผู้สัมภาษณ์]. ไทยรัฐ, สืบค้นเมื่อ 10 พฤศจิกายน 2550, จาก <http://www.sko.moph.go.th/content.asp?contentid=6414>
3. Arendash GW, Mori T, Cao C, Mamcarz M, Runfeldt M, Dickson A, Rezai-Zadeh K, Tan J, Citron BA, Lin X, Echeverria V, and Potter H (2009) Caffeine Reverses Cognitive Impairment and Decreases Brain Amyloid- β Levels in Aged Alzheimer's Disease Mice; *Journal of Alzheimer's Disease*, Volume 17: 661-680.
4. Baliga, M.S., Meleth, S., and Katiyar, S.K. (2005). Growth inhibitory and antimetastatic effect of green tea polyphenols on metastasis-specific mouse mammary carcinoma 4T1 cells in vitro and in vivo systems. *Clinical Cancer Research*. 11 (5), 1918-1927.
5. Cao C, Cirrito JR, Lin X, Wang L, Verges DK, Dickson A, Mamcarz M, Zhang C, Mori T, Arendash GW, Holzman DM, and Potter H (2009) Caffeine Suppresses Amyloid- β Levels in Plasma and Brain of Alzheimer's Disease Transgenic Mice. *Journal of Alzheimer's Disease*, Volume 17: 681-697.
6. Cassel, J.C., Cassel, S., Galani, R., Kelche, C., Will, B., and Jarrard, L. (1998). Fimbria-fornix vs selective hippocampal lesions in rats: effects on locomotor activity and spatial learning and memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 62(1), 22-45.
7. Chen, L., Richardson, J. S., Caldwell, J. E. and Ang, L. C. (1994). Regional brain activity of free radical defense enzymes in autophy samples from patients with Alzheimer' disease and from nondemented controls. *International Journal of Neuroscience*, 75, 83-90.
8. Cheon, J. J., Ho, Y. C., Hun, L. W., Kyu, P. K., Chae, C. Y., Choi, Y. H., et al. (2005). Effects of Bambusae concretio salicea (Chunchukhwang) on amyloid β -induced cell toxicity and antioxidative enzymes in cultured rat neuronal astrocytes. *Journal of ethnopharmacology*, 98(3), 259-266.
9. Choi YT, Jung CH, Lee SR, Bae JH, Baek WK, Suh MH, Park J, Park CW, and Suh SI (2001). The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate attenuates β amyloid-induced neurotoxicity in cultured hippocampal neurons. *Life Sciences*, 70, 603-614.

10. Chu, C. T., Caruso, J. L., Cummings, T. J., Ervin, J., Rosenberg, C. and Hulette, C. M. (2000). Ubiquitin immunochemistry as a diagnostic aid for community pathologists evaluating patients who have dementia. *The United States and Canadian Academy of Pathology*, 13 (4), P. 420-426.
11. Coimbra S, Castro E, Rocha-Pereira P, Rebelo I, Rocha S, and Santos-Silva A (2005). The effect of green tea in oxidative stress. *Clinical Nutrition*, 25, 790-796.
12. Coimbra, S., Castro, E., Rocha-Pereira, P., Rebelo, I., Rocha, S., and Santos-Silva, A. (2006). The effect of green tea in oxidative stress. *Clinical Nutrition*, 25(5), 790-796.
13. D' Hooge, R., and Deyn, P. P. (2001). Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Research Review*, 36, 60-90.
14. Delobette, S., Privat, A., and Maurice, T., (1997). In vitro aggregation facilitates beta-amyloid peptides 25–35 induced amnesia in the rat. *European Journal of Pharmacology*, 319, 1–4.
15. DeToledo-Morrell L, Stoub TR, Bulgakova M, Wilson RS, Bennett DA, Leurgan S, Wu J, Turner DA (2004) MRI-derived entorhinal volume is a good predictor of conversion from MCI to AD. *Neurobiol Aging* 25:1197-1203.
16. Dong, Y. L., Zuo, P. P., Liu, Q. L., Hua, F., Dai, S. L., and Ge, Q. S. (2007). Protective effects of phytoestrogen α -zearalanol on beta amyloid 25–35 induced oxidative damage in cultured rat hippocampal neurons. *Endocrine*, 32(2), 206-211.
17. Erba, D., Riso, P., Bordoni, A., Foti, P., Biagi, P. L. and Testolin, G. (2005). Effectiveness of moderate green tea consumption on antioxidative status and plasma lipid profile in humans. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16, 144-149.
18. Farrer, L. A., Cupples, L. A., Haines, J. L., Hyman, B., Kukull, W. A., Mayeux, R., et al. (1997). Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer disease meta analysis consortium. *Journal of the American Medical Association*. 278(16), 1349-1356.
19. Floresco SB, Seamans JK, Phillips AG (1997) Selective roles for hippocampal, prefrontal cortical, and ventral striatal circuits in radial-arm maze tasks with or without a delay. *J Neurosci* 17, 1880-1890.
20. Francis, P. T., Palmer, A. M., Snape, M. and Wilcock, G. K. (1999). The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 66, 137-147.
21. Freese, R., Basu, S., Hietanen, E., Nair, J., Nakachi, K., Bartsch, H., et al. (1999). Green tea extract decreases plasma malondialdehyde concentration but dose not affect other

- indicators of oxidative stress, nitric oxide production, or hemostatic factors during a high-linoleic acid diet in healthy females. *European Journal of Nutrition*, 38, 149-157.
22. Giovannellia, L., Casamentia, F., Scalia, C., Bartolinia, L. and Pepeu, G. (1995). Differential effects of amyloid peptides β -(1–40) and β -(25–35) injections into the rat nucleus basalis. *Neuroscience*, 66 (4), 781-792.
 23. Grayson, B., Idris, N. F. and Neill, J.C. (2007). A typical antipsychotics attenuate a sub-chronic PCP-induced cognitive deficit in the novel object recognition task in the rat. *Behavioural Brain Research*, 184(1), 31-38.
 24. Gupta, S. , Hastak, K. , Ahmad, N. , Lewin, J. S. , and Mukhtar, H. (2001). Inhibition of prostate carcinogenesis in TRAMP mice by oral infusion of green tea polyphenols. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98 (18), 10350–10355.
 25. Halliwell B. (2001). Role of free radicals in the neurodegenerative disease: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging*, 18 (9), 685-716.
 26. Haque AM, Hashimoto M, Katakura M, Tanabe Y, Hara Y, and Shido O. (2006). Long-Term Administration of Green Tea Catechins Improves Spatial Cognition Learning Ability in Rats. *Journal of Nutrition*, 136, 1043-1047.
 27. Haque, A. M., Hashimoto, M., Katakura, M., Hara, Y., and Shido, O. (2008). Green tea catechins prevent cognitive deficits caused by A β 1–40 in rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 19(9), 619-626.
 28. Harkany, T., Mulder, J., Sasvan, M., Abraham, I., Konya, C., Zarandi, M., et al. (1999). N-Methyl-d-aspartate receptor antagonist MK-801 and radical scavengers protect cholinergic nucleus basalis neurons against β -amyloid neurotoxicity. *Neurobiology of Disease*, 6, 109–21.
 29. Hooper, N. M. (2005). Roles of proteolysis and lipid rafts in the processing of the amyloid precursor protein and prion protein. *Biochemical Society Transactions*, 33, 335–338.
 30. Inestrosa, N. C., Alvarez, A., Pérez, C. A., Moreno, R. D., Vicente, M., Linker, C., et al. (1996). Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid-beta-peptides into Alzheimer's fibrils: possible role of the peripheral site of the enzyme. *Neuron*, 16 (4), 881-891.
 31. Iwata, N., Higuchi, M., and Saido T. C. (2005). Metabolism of amyloid- β peptide and Alzheimer's disease. *Pharmacology & Therapeutics*, 108(2), 129-148.
 32. Jin Y, Jin CH, & Row KH. (2005). Separation of catechin compounds from different teas. *Biotechnology-Journal* , 1, 209-213.

33. Kaur, T., Pathak, C. M., Pandhi, P., and Khanduja, K. L. (2008). Effects of green tea extract on learning, memory, and behavior and acetylcholinesterase activity in young and old male rats. *Brain and Cognition*, 67(1), 25-30.
34. Kanemitsu, H., Tomiyama, T. and Mori, H. (2003). Human neprilysin is capable of degrading amyloid β peptide not only in the monomeric form but also the pathological oligomeric form. *Neuroscience Letters*, 350 (2), 113-116.
35. Kovacs, D. M., Fausett, H. J., Page, K. J., Kim, W. T., Moir R. D., Merriam, D. E., et al. (1996). Alzheimer-associated presenilins 1 and 2 : Neuronal expression in brain and localization to intracellular membranes in mammalian cells. *Nature Medicine*, 2, 224-229.
36. Khan N and Mukhtar H. (2007). Tea polyphenols for health promotion. *Life Sciences*.
37. Khan SA, Priyamvada S, Arivarasu NA, Khan S, and Yusufi AN. (2007). Influence of green tea on enzymes of carbohydrate metabolism, antioxidant defense, and plasma membrane in rat tissues. *Nutrition*, 23, 287-695.
38. Khan SG, Katiyar SK, Agarwal R, and Mukhtar H. (1992). Enhancement of antioxidant and phase II enzymes by oral feeding of green tea polyphenols in drinking water to SKH-1 hairless mice: possible role in cancer chemoprevention. *Cancer Res*, 52, 4050-4052.
39. Kim, H.C., Yamada, K., Nitta, A., Olariu, A., Tran, M.H., Mizuno, M., et al. (2003). Immunocytochemical evidence that amyloid beta1-42 impairs endogenous antioxidant systems in vivo. *Neuroscience*, 119(2), 399-419.
40. Kish, S. J., Morito, C. L. and Hornykiewicz, O. (1986). Brain Glutathione peroxidase in neurodegenerative disorders. *Neurochemical Pathology*, 4, 23-28.
41. Kolb, B., Cioe, J., and Wendy, C. (2008). Contrasting effects of motor and visual spatial learning tasks on dendritic arborization and spine density in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 90(2), 295-300.
42. Komatsu M, and Hiramatsu M. (2000). The efficacy of an antioxidant cocktail on lipid peroxide level and superoxide dismutase activity in aged rat brain and DNA damage in iron-induced epileptogenic foci. *Toxicology*, 148, 143-8.
43. Kondo M, Kita K, and Yokota H. (2004) Feeding value to goats whole-crop oat ensiled with green tea waste. *Animal Feed Science and Technology*, 113, 71-81.
44. Koo SI and Noh SK. (2006). Green tea as inhibitor of the intestinal absorption of lipids: potential mechanism for its lipid-lowering effect. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 18, 179-183.

45. Kovacs, D. M., Fausett, H. J., Page, K. J., Kim, W. T., Moir, R. D., Merriam, D. E., et al. (1996). Alzheimer-associated presenilins 1 and 2 : Neuronal expression in brain and localization to intracellular membranes in mammalian cells. *Nature Medicine*, 2, 224-229.
46. Inestrosa, N. C., Alvarez, A., Pérez, C. A., Moreno, R. D., Vicente, M., Linker, C., et al. (1996). Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid-beta-peptides into Alzheimer's fibrils: possible role of the peripheral site of the enzyme. *Neuron*, 16 (4), 881-891.
47. Laura, M., Ping, L. Y., Rong, L. Y., George, W. C. and Allan, C. H. (2003). Stimulatory effect of oral administration of green tea and caffeine on locomotor activity in SKH-1 mice. *Life Sciences*, 73(11), 1383-1392.
48. Lendon CL, Ashall F, Goate AG. (1997) Exploring the etiology of Alzheimer's disease using molecular genetics. *Journal of the American Medical Association*, 277(10), 825-831.
49. Li, M., Chen, L., Lee, D. H. S., Yu, L., Zhang, Y. (2007). The role of intracellular amyloid β in Alzheimer's disease. *Progress in Neurobiology*, 83, (3), 131-139.
50. Lovell, M. A., Ehmann, W. D., Butler, S. M. Markesbery, W. R. (1995). Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in brain in Alzheimer's disease. *Neurology*, 45, 1594-1601.
51. Ma, J., Yee, A., Brewer, H. B. Jr, Das, S. and Potter .H. (2002). Amyloid-associated proteins α 1-antichymotrypsin and apolipoprotein E promote assembly of Alzheimer β -protein into filaments. *Nature*, 372, 92-94.
52. Marcus, D. L., Thomas, C., Rodriguez, C., Simberkoff, K., Tsai, J. S., Strafci, J. A., et al. (1998). Increased lipidperoxidation and reduced antioxidant enzyme activity in Alzheimer's disease. *Experimental Neurology*, 150, 40-44.
53. Mantena, S., K., Meeran, S., M., Elmets, C., A., and Katiyar, S., K. (2005). Orally administered green tea polyphenols prevent ultraviolet radiation-induced skin cancer in mice through activation of cytotoxic T-cells and inhibition of angiogenesis in tumors. *Journal of Nutrition*, 135 (12), 2871-2877.
54. Mattson, M. P. (2003). Gene-diet interactions in brain aging and neurodegenerative disorders. *Annals of Internal Medicine*, 139 (5), 441-444.
55. Mattson, M. P. (2004). Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature*, 430, 631-639.
56. Mayeux, R. (2003). Epidemiology of neurodegeneration. *Annual Review of Neuroscience*, 26, 81-104.

57. Maurice, T., Su, T. P., and Privat, A., (1998). Sigma1 (sigma 1) receptor agonists and neurosteroids attenuate beta 25–35-amyloid peptide-induced amnesia in mice through a common mechanism, *Neuroscience*, 83, 413–428.
58. Morris R. G. M. (n.d.). Morris water maze. สืบค้นเมื่อ 19 สิงหาคม 2551, จาก http://www.scholarpedia.org/article/Morris_water_maze
59. Micale, V., Leggio G. M., Mazzola, C., and Drago F. (2006). Cognitive effects of SL65.0155, a serotonin 5-HT4 receptor partial agonist, in animal models of amnesia. *Brain Research*, 1121(1), 207-215.
60. Mizuno, Y. and Ohta, K. (1986). Increased lipid peroxidation and superoxide dismutase activity in adult and aged brain. *Journal of Neurochemistry*, 46, 1344-1352.
61. Murakami, T. and Oshato, K. (2003). Dietary green tea intake preserves and improves arterial compliance and endothelial function. *Journal of the American College of Cardiology*, 41(6), 271.
62. Nakachi, K., Matsuyama, S., Miyake, S., Suganuma, M., and Imai, K. (2000). Preventive effects of drinking green tea on cancer and cardiovascular disease: epidemiological evidence for multiple targeting prevention. *Biofactors*, 13, (1– 4), 49-54.
63. Nakagawa T & Yokozawa T. (2002). Direct scavenging of nitric oxide and superoxide by green tea. *Food and Chemical Toxicology*, 40, 1745-1750.
64. Nanjo, F., Goto, K., Seto, R., Suzuki, M., Sakai, M., and Hara, Y. (1996). Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free Radical Biology and Medicine*, 21(6), 895-902.
65. Nanjo F et al. (1999). The antioxidative property of green tea against iron-induced oxidative stress in rat brain. *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 63 (9), 1621-1623.
66. Namba, Y., Tomonaga, M., Kawasaki, H., Otomo, E., Ikeda, K. (1991). Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain Research*, 541(1), 163-166.
67. Nerelius, C., Johansson, J., Sandegren, A. (2009). Amyloid beta-peptide aggregation. What does it result in and how can it be prevented? *Frontiers in Bioscience*, 14, 1716-1729.
68. Olton, D.S., and Samuelson, R.J. (1976). Remembrance of places passed: Spatial memory in rats. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 2, 97-116.
69. Parihar, M. S. and Hemnani, T. (2004). Alzheimer's disease pathogenesis and therapeutic interventions. *Journal of Clinical Neuroscience*, 11(5), 456-467.

70. Peters, U., Poole, C., and Arab, L. (2001). Does tea affect cardiovascular disease? A meta-analysis. *American Journal of Epidemiology*, 154 (6), 495- 503.
71. Pike, C. J., Brudick, D., Walencevicz, A. J., Glabe, C. G., and Cotman, C. W., (1993). Neurodegeneration induced by β -amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state, *Journal of Neuroscience*, 13, 1676–1687.
72. Raber, J., and Benice, T. S. (2006). Using EthoVision XT for studying object recognition in mice. *Noldus News*, 13(2), 5.
73. Ray, W. J., Ashall, F., and DPhil, A. M. G. (1998). Molecular pathogenesis of sporadic and familial forms of Alzheimer's disease. *Molecular Medicine Today*, 4(4), 151-157.
74. Rezai-Zadeha, K., Arendashb, G. W., Houa, H., Fernandez, F., Jensenb, M., Runfeldtb, M., et al. (2008). Green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG) reduces β -amyloid mediated cognitive impairment and modulates tau pathology in Alzheimer transgenic mice. *Brain Research*, 1214, 177-187.
75. Richardson, J. S. (1993). Free Radical in The genesis of Alzheimer's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 695, 73-76.
76. Rivière, C., Richard, T., Vitrac, X., Mérillon, J. M., Valls, J. and Monti, J. P. (2008). New polyphenols active on β -amyloid aggregation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 18, 828-831.
77. Rosemary, A. C., Timothy, J. B., and Lisa, M. S. (2006). Why Does Brain Damage Impair Memory? A Connectionist Model of Object Recognition Memory in Perirhinal Cortex. *The Journal of Neuroscience*, 26(47), 12186-12197.
78. Rudi, D., and Peter, P. (2001). Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Research Reviews*, 36(1), 60-90.
79. Saido T. C., and Iwata, N. (2006). Metabolism of amyloid- β peptide and pathogenesis of Alzheimer's disease towards presymptomatic diagnosis, prevention and therapy. *Neuroscience Research*, 54, 235-253.
80. Selkoe, D.J. (2001). Clearing the brain's amyloid cobwebs. *Neuron*, 32 (2), 177-180.
81. Selkoe, D. J., Schenk, D. (2003). Alzheimer's disease: molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 43, 545-584.
82. Seubert, P., Oltersdorf, T., Lee, M. G., Barbour, R., Blomquist, C., Davis, D. L., et al. (1993). Secretion of β -amyloid precursor protein cleaved at the amino terminus of the β -amyloid peptide. *Nature*, 361, 260–263.

83. Shen, Y. X., Xu, S. Y., Wei, W., Sun, X. X., Liu, L. H., Yang, et al. (2002). The protective effects of melatonin from oxidative damage induced by amyloid beta-peptide 25-35 in middle-aged rats. *Journal of Pineal Research*, 32(2), 85-89.
84. Shimizu, M., Deguchi, A., Lim, J. T.E., Moriwaki, H., Kopelovich, L. and Weinstein, I. B. (2005). (–)-Epigallocatechin gallate and polyphenon E inhibit growth and activation of the epidermal growth factor receptor and human epidermal growth factor receptor-2 signaling pathways in human colon cancer cells. *Clinical Cancer Research*, 11 (7), 2735–2746
85. Sipos E., Kurunczi A., Kasza A., Horvath J., Felszeghy K., Laroche S., Toldi J., Parducz A., Penke B. and Penke Z. (2007). β -amyloid pathology in the entorhinal cortex of rats induces memory deficits: implications for Alzheimer's disease. *Neuroscience* 147 (2007) 28-36.
86. Skrzydlewska, E., Ostrowska, J., Farbiszewski, R. and Michalak, K. (2002). Protective effect of green tea against lipid peroxidation in the rat liver, blood serum and the brain. *Phytomedicine*, 9, 232-238.
87. Spowart-Manning L, van der Staay FJ (2005) Spatial discrimination deficits by excitotoxic lesions in the Morris water escape task. *Behav Brain Res* 156, 269-276.
88. Stackman, R. W., and Walsh, T. H. (1995). Anatomical specificity and time-dependence of chlordiazepoxide-induced spatial memory impairments. *Behavioral Neuroscience*, 109(1), 436.
89. Stepanichev, M. Yu., Moiseeva, Yu. V., Lazareva, N. A., Onufriev, M. V., and Gulyaeva, N. V. (2003). Single intracerebroventricular administration of amyloid-beta25–35 peptide induces impairment in short-term rather than long-term memory in rats. *Brain Research Bulletin*, 61(2), 197-205.
90. Stepanichev, M., Zdobnova, I., Zarubenko, I., Lazareva, N., and Gulyaeva, N. V. (2006). Differential effects of tumor necrosis factor-alpha co-administered with amyloid beta-peptide (25-35) on memory function and hippocampal damage in rat. *Behavioural Brain Research*, 175, 352-361.
91. Stoub TR, DeToledo-Morrell L, Stebbins GT, Leurgans S, Bennett DA, Shan RC (2006) Hippocampal disconnection contributes to memory dysfunction in individuals at risk for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:10041-10045.
92. Strittmatter, W. J. and Roses, A. D. (1996). Apolipoprotein E and Alzheimer's disease. *Annual Review of Neuroscience*, 19, 53-77.
93. Strittmatter, W. J., Saunders, A. M., Schmechel, D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G. S., and Roses, A. D. (1993). Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and

- increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. The Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 90(5), 1977–1981.
94. Tohda, C., Tamura, T., and Komatsu K. (2003). Repair of amyloid β 25-35 induce memory impairment and synaptic loss by a Kampo formula, Zokumei-to. Brain Research, 990, 141-147.
 95. Tsunekawa, H., Noda, Y., Mouri, A. Yoneda, F. and Nabeshima, T. (2008). Synergistic effects of selegiline and donepezil on cognitive impairment induced by amyloid beta (25-35). Behavioural Brain Research, 1-9.
 96. Um, M. Y., Choi, W. H., Aan, J. Y., Kim, S. R. and Ha, T. Y. (2006). Protective effect of Polygonum multiflorum Thunb on amyloid β -peptide 25-35 induced cognitive deficits in mice. Journal of Ethnopharmacology, 104(1-2), 144-148.
 97. University of South Florida Health (2009, July 6). Caffeine Reverses Memory Impairment In Mice With Alzheimer's Symptoms. ScienceDaily. Retrieved August 10, 2009, from <http://www.sciencedaily.com/releases/2009/07/090705215237.htm>
 98. Unno, K., Takabayashi, F., Kishido, T., and Oku, N. (2004). Suppressive effect of green tea catechins on morphologic and functional regression of the brain in aged mice with accelerated senescence (SAMP10). Experimental Gerontology, 39(7), 1027-1034.
 99. Unno, K., Takabayashi, F., Yoshida, H., Choba, D., Fukutomi, R., Kikunaga, N., et al. (2007). Daily consumption of green tea catechin delays memory regression in aged mice. Biogerontology, 8(2), 89-95.
 100. Vignesa, M., Mauriceb, T., Lantéa, F., Nedjara, M., Thethia, K., Guiramanda, J., et al. (2006). Anxiolytic properties of green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate (EGCG). Brain Research, 1110(1), 102-115.
 101. Walsh, T.J., and Opello, K.D. (1994). The use of AF64A to model Alzheimer's disease. New York: Plenum Press.
 102. Weinreb, O., Mandel, S., Amit, T., and Moussa, B. (2004). Neurological mechanisms of green tea polyphenols in Alzheimer's and Parkinson's diseases. Journal of Nutritional Biochemistry, 15(9), 506-516.
 103. Wisniewski, T., Castano, E. M., Golabek, A., Vogel, T. and Frangione, B. (1994). Acceleration of Alzheimer's fibril formation by apolipoprotein E in vitro. American Journal of Pathology, 145, 1030-1035.
 104. Yamada, K., and Nabeshima, T. (2000). Animal models of Alzheimer's disease and evaluation of anti-dementia drugs. Pharmacology & Therapeutics, 88(2), 93-113.

105. Yamaguchi, Y. and Kawashima, S. (2001). Effects of amyloid- β -(25–35) on passive avoidance, radial-arm maze learning and choline acetyltransferase activity in the rat. *European Journal of Pharmacology*, 412 (3), 265-272.
106. Yang, C., J., Yang, I., Y., Oh, D., H., Bae, I., H., Cho, S., G., Kong, I., G., et al. (2003). Effect of green tea by-product on performance and body composition in broiler chicks, *Asian-australasian journal of animal sciences*, 16(6), 867-872
107. Yatin SM, Aksenov M, Butterfiel DA (1999). The antioxidant vitamin E modulates amyloid β -peptide-induced creatine kinase activity inhibition and increased protein oxidation: implications for the free radical hypothesis of Alzheimer's disease. *Neurochem Res*, 24, 427-35.

ภาคผนวก ก.



เอกสารรับรองโครงการวิจัยในสัตว์ทดลอง
คณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยนเรศวร

ชื่อโครงการ	การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากกากชาเขียวต่อการเรียนรู้และความจำ Screening of the effects of extracts from green tea byproduct on learning and memory
ชื่อผู้ดำเนินโครงการ	ดร.พรนรินทร์ เทพวราพฤกษ์
เลขที่โครงการ/รหัส	51 04 0004
สังกัดหน่วยงาน/คณะ	วิทยาศาสตร์การแพทย์
การรับรอง	ขอรับรองโครงการวิจัยดังกล่าวข้างบนนี้ ได้ผ่านการพิจารณาและรับรอง จากคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ครั้งที่ 1/2551 วันที่ 22 เมษายน 2551
ลงนาม	วิบูล วัฒนาร (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิบูลย์ วัฒนาร) ประธานคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ภาคผนวก ข.

เปรียบเทียบโครมาโตแกรมที่ได้จากสารสกัดชาเขียวและกากชาเขียว

